



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional**

Unidad Zacatenco

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

**Obtención de neurexina 1 β , teneurina-2 y FLRT-3 como
ligandos solubles sintéticos del receptor latrofilina-1**

T E S I S

que presenta

Q.F.B. José Carlos Ovando Zambrano

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

en la especialidad de Neurobiología Celular y Molecular

Directores de Tesis:

Dr. José Antonio Arias Montaña

Dr. Antony Boucard Jr.

México, D.F.

Agosto, 2015

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante la realización de la Maestría.

Al Dr. Antony Boucard Jr y al Dr. José Antonio Arias Montaña por la confianza, el apoyo que me brindaron para la realización de la tesis y por sus conocimientos que me compartieron durante este tiempo.

Al Dr. Benjamín Florán Garduño y al Dr. Ricardo Félix Grijalva por sus aportaciones y sus consejos para la realización de este trabajo de Maestría.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 37 de Neurociencias y del laboratorio 54 de Biología Celular por su apoyo y sus consejos brindados durante este tiempo.

A mis papás y en especial a mí madre, por su apoyo incondicional, el amor y cariño que me ha brindado, y porque es el motor principal de todos mis logros.

Índice

Resumen	VI
Abstract	VIII
Abreviaturas	X
1. Introducción.....	1
1.1 Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs).....	1
1.1.1 Activación de los GPCRs.....	2
1.1.2 Activación de las proteínas G.....	3
1.1.3 Clasificación de los GPCRs.....	6
1.2 Latrofilinas.....	8
1.2.1 Relevancia de las latrofilinas en procesos fisiológicos y patológicos.....	11
1.2.2 Ligandos de las latrofilinas.....	13
1.2.2.1 Teneurinas.....	13
1.2.2.2 Neurexinas.....	14
1.2.2.3 FLRTs.....	15
2. Justificación.....	17
3. Hipótesis.....	18
4. Objetivos.....	19
4.1 Objetivo general.....	19
4.2 Objetivo específico.....	19
5. Materiales y métodos.....	20
5.1 Generación de vectores de expresión.....	20
5.1.1 Generación del vector IgG a partir de pCMV Ig Bai 3.2.....	20
5.1.2 Generación de la teneurina-2 soluble.....	20
5.1.3 Generación de neurexina 1- β soluble.....	21
5.1.4 Generación de FLRT3 soluble.....	21
5.2 PCR de punto final.....	21
5.3 Ensayos de ligación.....	21
5.4 Extracción y purificación de ADN plasmídico.....	23
5.4.1 Extracción de ADN plasmídico.....	23
5.4.2 Purificación del ADN plasmídico.....	23
5.5 Transfección celular por el método de PEI (polietilenimina).....	24
5.5.1 Preparación de la PEI.....	24
5.5.2 Transfección.....	24
5.6 Transfección por el método de fosfato de calcio.....	25
5.7 Producción y purificación de ligandos sintéticos.....	25

5.8 Tinción con azul de Comassie.....	26
5.9 Ensayos de inmunodetección (Western Blot).....	27
5.9.1 Extracción de proteínas transmembranales.....	27
5.9.2 Extracción de proteínas totales (método directo).....	27
5.9.3 Western Blot.....	28
5.9.4 Revelado.....	28
6. Resultados.....	29
6.1 Generación de vectores de expresión.....	29
6.1.1 Restricción enzimática.....	29
6.1.2 PCR de punto final.....	32
6.1.3 Ensayos de ligación.....	32
6.1.4 Secuenciación de las nuevas construcciones plasmídicas.....	35
6.2 Expresión de los ligandos solubles sintéticos del receptor latrofilina-1.....	37
6.3 Optimización de la expresión heteróloga del receptor latrofilina-1.....	41
6.4 Comprobación de la expresión del receptor latrofilina-1 (isoformas Lphn-1 Δ A, Δ B y Lphn-1 Δ A) por ensayo de Western Blot	45
7. Discusión.....	47
8. Conclusiones.....	50
9. Perspectivas.....	51
10. Referencias.....	52

Índice de figuras

Figura 1. Estructura de los GPCRs y modelo de la interacción con la proteína G.....	2
Figura 2. Representación esquemática de las vías de señalización inducidas por activación de los GPCRs.....	5
Figura 3. Ciclo de activación y desactivación de las proteínas G.....	5
Figura 4. Clasificación de los GPCRs con base en su relación filogenética en el genoma humano.....	8
Figura 5. Modelo de la organización estructural de las latrofilinas.....	9
Figura 6. Expresión de las latrofilinas en el organismo.....	10
Figura 7. Estructura de los dominios de las teneurinas.....	13
Figura 8. Esquema de la organización estructural de los dominios de la α -neurexina y de la β -neurexina.....	14
Figura 9. Representación esquemática de la estructura y organización de los dominios de la FLRT-3.....	16
Figura 10. Análisis de restricción de los plásmidos de interés.....	30
Figura 11. Análisis de restricción de los plásmidos que contienen las 3 isoformas de la latrofilina-1.....	31
Figura 12. Restricción del plásmido vector.....	31
Figura 13. Productos de PCR de punto final.....	33
Figura 14. Análisis de restricción de las nuevas construcciones plasmídicas.....	33
Figura 15. Mapas de las construcciones plasmídicas que corresponden a los ligandos solubles sintéticos.....	34
Figura 16. Secuencia de nucleótidos correspondientes a neurexina 1 β (<i>Mus Musculus</i>) contenida en el plásmido pCMV-Ig-neurexina1 β -TEV.....	35

Figura 17. Secuencia de nucleótidos correspondientes a FLRT-3 (<i>Homo Sapiens</i>) contenida en el plásmido pCMV-Ig-FLRT3-HA-TEV.....	36
Figura 18. Secuencia de nucleótidos correspondientes a teneurina-2 (<i>Synthetic construct Loss-B gene complete CDS</i>) contenida en el plásmido pCMV-Ig-Ten2-Flag-TEV.....	36
Figura 19. Expresión de los ligandos por células HEK-293 transfectadas....	37
Figura 20. Expresión de los ligandos por células HEK-293T transfectadas..	38
Figura 21. Western blot que muestra la expresión de ligandos solubles sintéticos por las células HEK-293T.....	39
Figura 22. Ligandos sintéticos purificados.....	40
Figura 23. Análisis por citometría de flujo de la expresión de la proteína verde fluorescente por células HEK-293T transfectadas.....	41
Figura 24. Análisis por citometría de flujo de la expresión de la proteína verde fluorescente por células HEK-293T transfectadas con el plásmido pCMV-GFP y el método de PEI.....	43
Figura 25. Análisis por citometría de flujo de la expresión de la latrofilina-1 fusionada con la proteína Venus fluorescente por células HEK-293T transfectadas con el plásmido pCMV-CL1-mV y el método de PEI.....	44
Figura 26. Expresión del receptor latrofilina-1 (isoformas Lphn-1 Δ A, Δ B y Lphn-1 Δ A) por células HEK-293T transfectadas.....	46

Resumen

Las latrofilinas son miembros de la subfamilia de receptores acoplados a proteínas G de adhesión (aGPCR). Este grupo de proteínas transmembranales se caracteriza por la presencia de un sitio proteolítico (GPS), que separa el dominio amino terminal (NTF) de la región carboxilo terminal (CTF). El NTF comprende motivos de adhesión extracelulares y un dominio lectina (LEC) seguido de un dominio olfactomedina (OLF), mientras que el CTF abarca los siete dominios transmembranales y el extremo citoplasmático. De las tres isoformas de latrofilina (latrofilinas1-3), la latrofilina-1 muestra mayor expresión en el cerebro.

Las funciones de adhesión de la latrofilina-1 residen en sus dominios LEC /OLF, los cuales interactúan con tres tipos de ligandos endógenos: neurexinas, teneurinas y FLRT. El gen de la latrofilina-1 experimenta procesos de corte y empalme alternativo en dos sitios distintos, uno extracelular (SSA) y un segundo intracelular (SSB), resultando en la inserción de 5 y 44 aa, respectivamente. El empalme SSA modula selectivamente las interacciones de la latrofilina-1 con sus ligandos, pero no se conoce con certeza si la latrofilina-1 induce señalización intracelular al ser activada por sus ligandos, y si el empalme SSB modula dicho perfil de señalización. En este trabajo hipotetizamos que la señalización de la latrofilina-1 depende de la unión de ligando y que el empalme en SSB podría regular las interacciones intracelulares conduciendo a diferencias en la señalización.

En este trabajo se generaron herramientas moleculares para el estudio de la señalización intracelular mediada por la latrofilina-1 mediante: a) generación de formas solubles de ligandos de la latrofilina-1, y b) expresión heteróloga de isoformas SSB de la latrofilina-1.

A fin de generar ligandos solubles para la latrofilina-1, se diseñaron tres ADNc diferentes que contienen las regiones extracelulares de neurexina 1 β , teneurina 2 o FLRT3, fusionadas a la fracción constante de IgG humana. Los plásmidos fueron analizados para la expresión de las proteínas en un sistema eucariote y las

proteínas obtenidas se purificaron a partir del medio celular en un solo paso, para ser analizadas por electroforesis y Western blot. Se obtuvieron cantidades cuantificables de cada ligando, con una mayor producción de la neurexina 1 β .

Con el fin de caracterizar a las isoformas de empalme SSB de la latrofilina-1, se optimizó un método basado en polietilenimina para la transfección de células eucariotas para expresar a las isoformas Lphn-1 Δ A, Δ B^{HA} y Lphn-1 Δ A^{HA}, que carece y que contiene un inserto SSB, respectivamente. Mediante inmunodetección (Western Blot) se confirmó la escisión del GPS así como el peso molecular distinto del CTF en ambas isoformas.

En conclusión, se produjeron ligandos solubles de la latrofilina-1 purificados en cantidades suficientes para los ensayos funcionales, y se confirmó la expresión apropiada de dos isoformas de empalme SSB de la latrofilina-1. Estas herramientas permitirán realizar ensayos de señalización intracelular en un futuro próximo, dando prioridad a verificar el acople de la latrofilina-1 a proteínas G.

Abstract

Latrophilins are part of the adhesion G protein-coupled receptor (aGPCR) family of transmembrane proteins characterized by the presence of a GPCR proteolytic site (GPS), separating a N-terminal region (NTF) from a C-terminal region (CTF). The NTF comprises extracellular adhesion motifs, a Lectin domain (LEC) followed by an Olfactomedin domain (OLF), while the CTF encompasses seven transmembrane domains followed by a cytoplasmic tail. Amongst the three isoforms of latrophilins (latrophilin1-3), latrophilin-1 expression is most abundant in brain. The adhesion functions of latrophilin-1 rely on its LEC/OLF domains interacting with three endogenous ligands: neurexins, teneurins and FLRT. The gene for latrophilin-1 undergoes alternative splicing at two distinct sites: an extracellular site (SSA) and an intracellular site (SSB), resulting in the inclusion of 5 and 44 amino acids inserts respectively. While splicing at SSA selectively modulates latrophilin-1 interactions with its ligands, it is unclear whether the latrophilina-1 can induce intracellular signaling by activating ligands and whether splicing at SSB modulates latrophilin-1 signaling profile.

For this work we hypothesized that latrophilin-1 signaling is ligand-dependent and that splicing at SSB might regulate intracellular interactions leading to differential signaling. In this thesis we sought to generate molecular tools in order to study latrophilin-1-mediated cell signaling by a) generating soluble forms of latrophilin-1 ligands and b) expressing SSB isoforms for latrophilin-1.

In order to generate soluble ligands for latrophilin-1, we designed three different cDNAs containing the extracellular regions of neurexina 1 β , teneurin2 or FLRT3 fused to the constant fraction of human IgG. The resulting plasmids were tested for eukaryotic protein expression and the proteins were purified from the cell media in a single step followed by analysis through gel electrophoresis and western blotting. Quantifiable amounts of each ligand were obtained, soluble neurexin 1 β being the most robustly expressed. In order to characterize SSB splice isoforms of latrophilin-1, we first optimized a polyethyleneimine-based method for the transfection of eukaryotic cells to express Lphn-1 Δ A, Δ B^{HA} and Lphn-1 Δ A^{HA},

isoforms lacking and containing an SSB insert respectively. Using Western blotting analysis, we confirmed the GPS cleavage event as well as the distinct molecular weight of the CTF between both isoforms.

In conclusion, purified amounts of soluble ligands for latrophilin-1 were produced and the proper expression of two SSB splice isoforms for latrophilin-1 was confirmed. The generation of these tools will allow cell-signaling assays to be conducted in the near future, priority being given to verifying the coupling of latrophilin-1 to G proteins.

Abreviaturas

a	Aminoácidos
AC	Adenilato ciclasa
ADP	Difosfato de adenosina
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
DAG	Diacilglicerol
DAT	Transportador de dopamina
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FLRTs	Proteínas transmembranales con repetidos ricos en leucina y fibronectina
FURA-2/AM	Fura-2 acetoximetil éster
GABA	Acido γ -aminobutírico
GDP	Difosfato de guanosina
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
GTP	Trifosfato de guanosina
HBM	Solución amortiguadora a base de Hepes
HEK-293	Células de riñón embrionario humano 293
IP ₃	1,4,5-Trifosfato de inositol
KRH	Krebs-Ringer-Hepes
mGluR	Receptor metabotrópico a glutamato
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos (<i>Phosphate-buffered saline</i>)
PEI	Polietilenimina
PIP ₂	4,5-Bifosfato de fosfatidil-inositol
PKA	Cinasa A de proteínas
PLC	Fosfolipasa C
RGS	Proteína reguladora de la señalización de proteínas G
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SERT	Transportador de serotonina
SFB	Suero fetal bovino
SNC	Sistema Nervioso Central
TDAH	Trastorno de déficit de atención e hiperactividad

1. Introducción

Todas las células del organismo se comunican entre ellas a fin de realizar una tarea común, que puede traducirse en una respuesta fisiológica. Las neuronas son un tipo de células especializadas, son excitables y se caracterizan por formar estructuras intercelulares de transmisión de información trans-neural, denominadas sinapsis, que permiten establecer redes de comunicación en el sistema nervioso. Cada neurona establece un promedio de 1000 conexiones sinápticas, puede recibir hasta 10 veces más conexiones y se ha estimado que si en el encéfalo existen unas 10^{11} neuronas, habrá $\sim 10^{14}$ sinapsis. La sinapsis se encuentra formada por: a) una membrana pre-sináptica en la que se encuentran vesículas que contienen neurotransmisores y que se concentran en la zona activa, la región de la membrana pre-sináptica donde son liberados los neurotransmisores; b) un espacio inter-sináptico o hendidura sináptica, región que separa a la membrana pre-sináptica de la membrana post-sináptica y donde son vertidos los neurotransmisores; y c) la membrana post-sináptica, que contiene receptores para los neurotransmisores.

Las moléculas de adhesión celular son responsables de eventos que conducen al establecimiento y mantenimiento de la sinapsis, además de conferirles propiedades específicas en función a la posición que ocupan en la red neural. Ejemplos de estas moléculas son las neurexinas, las neuroligandinas y las cadherinas; sin embargo, las características bioquímicas de este tipo de moléculas no se conocen del todo (1,2).

1.1 Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)

Otras moléculas que se han relacionado con la sinapsis son los GPCRs (por sus siglas en inglés), una gran familia de proteínas receptoras transmembranales que sensan el medio extracelular y activan vías de transducción de señales para generar una respuesta celular ante dicho estímulo como la proliferación, diferenciación y supervivencia celulares y la apertura de canales iónicos, entre muchas otras (3). Los GPCRs se encuentran formados estructuralmente por un

dominio amino terminal extracelular variable (4-50 aa), 7 dominios transmembranales (25-35 aa hidrofóbicos principalmente) conectados por 3 asas extracelulares y 3 asas intracelulares, y un dominio carboxilo terminal intracelular (4). Por sus características estructurales a estos receptores se les denomina también receptores con siete dominios transmembranales (Figura 1), y el sitio de acople a proteínas G se encuentra principalmente en la tercera asa intracelular y el dominio carboxilo terminal (5).

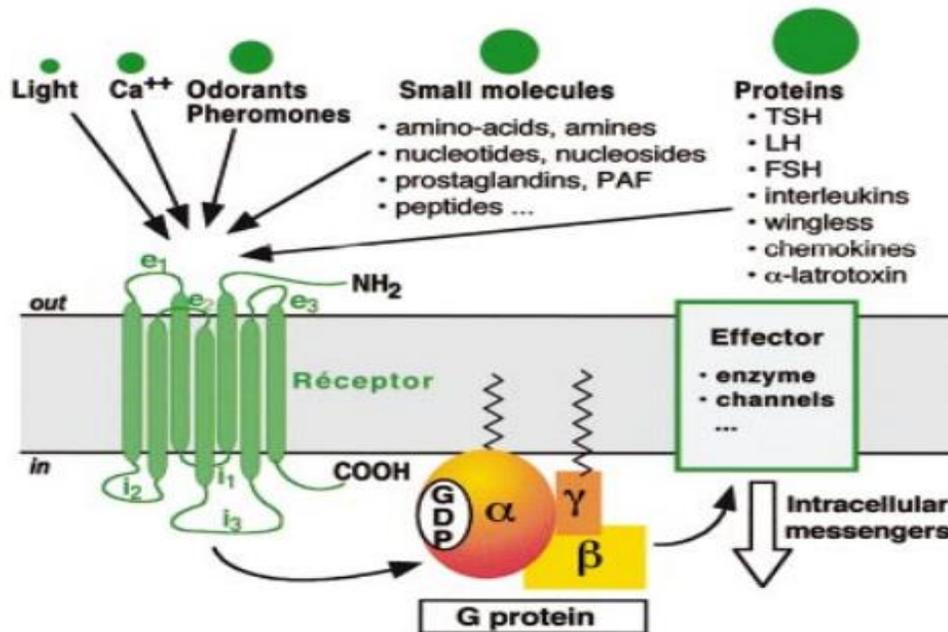


Figura 1. Estructura de los GPCRs y modelo de la interacción con la proteína G (6).

1.1.1 Activación de los GPCRs

Numerosos ligandos se unen a los GPCRs como las aminas biogénicas (adrenalina, serotonina, histamina, dopamina), péptidos (vasopresina, angiotensina, oxitocina), glicoproteínas (hormonas luteinizante, folículo estimulante, estimulante de la tiroides) y aminoácidos (glutamato, glicina, GABA).

Cuando el receptor entra en contacto con su ligando se rompe un cierre iónico que se forma por la interacción de la secuencia EDRY del dominio transmembranal 3 y los residuos acídicos del dominio transmembranal 6 principalmente (7). Como resultado el GPCR se reorganiza estructuralmente (cambio conformacional) para permitir la activación de la proteína G a la que esté acoplado (8). Gracias a estudios de biología molecular, bioquímica y biofísica se han desarrollado modelos de la interacción ligando-receptor.

No todos los ligandos ejercen la misma acción sobre los GPCRs cuando se unen a su sitio ortostérico (sitio de unión de ligandos endógenos), y se clasifican de acuerdo al efecto que producen en: a) agonistas totales y agonistas parciales (activan a los receptores con una eficacia máxima o inferior a la máxima, respectivamente); b) antagonistas (bloquean la unión del agonista); agonistas inversos (ligando que estabiliza al receptor en un estado menos activo que el inicial); y c) moduladores alostéricos, que se unen en un sitio topológicamente distinto al del ligando endógeno (9).

Los GPCRs activados pueden inducir 2 tipos de señalización, una dependiente de proteínas G, y otra independiente de ellas, referida la segunda fundamentalmente a la señalización dependiente de β -arrestinas (10,11). En este trabajo sólo nos referiremos a la señalización dependiente de proteínas G.

1.1.2 Activación de las proteínas G

Las proteínas G son una familia de proteínas que unen nucleótidos de guanina (GTP) y que desempeñan un papel muy importante en la transducción de señales de las células eucariontes. Por su estructura molecular se clasifican en heterotriméricas y monoméricas. Las heterotriméricas se encuentran formadas por 3 subunidades, α (39 a 45 kDa), β (35 a 39 kDa) y γ (6 a 8 kDa), y son proteínas ancladas a la membrana. Las proteínas monoméricas se encuentran libres en el citosol o el nucleoplasma. De las proteínas heterotriméricas se conocen al menos 20 subunidades α , 6 subunidades β y 11 subunidades γ (8,9,11), y dependiendo de la subunidad α se clasifican en 4 familias: $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i/o}$, $G_{\alpha q/11}$ y $G_{\alpha 12/13}$ (12).

Las proteínas Gas y Gai/o actúan sobre el mismo efector, las adenilato ciclasas (AC), enzimas que cataliza la reacción de conversión de ATP a AMPc; la proteína Gas las estimula, promoviendo el aumento de los niveles de AMPc intracelular, mientras que la proteína Gai/o las inhibe, disminuyendo los niveles del segundo mensajero (13,14).

Las proteínas $G_{\alpha_{q/11}}$ activan a la fosfolipasa C- β (PLC- β), enzima que cataliza la conversión del 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP_2) a 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) y diacilglicerol (DAG). El IP_3 promueven la liberación de calcio del retículo endoplásmico liso mientras que el DAG activa a la cinasa C de proteínas o PKC (15). Las proteínas $G_{\alpha_{12/13}}$ activan a GTPasas pequeñas como Rho, pudiendo éstas activar a otras proteínas como el intercambiador Na^+/H^+ o proteínas responsables de la regulación del citoesqueleto como las Rho-cinasas (ROCK) (11,12). El dímero $G_{\beta\gamma}$ puede actuar sobre canales iónicos u otros efectores (16,17) (Figura 2).

Cuando un GPCR es activado induce un cambio conformacional en los complejos $G_{\alpha}\text{-GDP}/G_{\beta\gamma}$, que conduce al intercambio de GDP por GTP, y la activación de la vía de señalización. El intercambio de GDP por GTP en la subunidad G_{α} genera un cambio conformacional en la misma, provocando que el complejo $G_{\alpha}\text{-GDP}/G_{\beta\gamma}$ se disocie del receptor y el desensamble de la subunidad G_{α} del dímero $G_{\beta\gamma}$. La subunidad $G_{\alpha}\text{-GTP}$ y el dímero $G_{\beta\gamma}$ transmiten las señales a diversos efectores dando lugar a la producción de los correspondientes segundos mensajeros involucrados en diversos procesos fisiológicos. La desactivación de la señalización de las proteínas G se debe a la hidrólisis del GTP a GDP por la actividad de GTPasa intrínseca de la proteína G_{α} , cuya tasa de hidrólisis es modulada por las RGS (proteínas reguladoras de la señalización de proteínas G) que actúan como GAPs (proteínas aceleradoras de la actividad de GTPasa). La subunidad inactiva ($G_{\alpha}\text{-GDP}$) se re asocia con el dímero $G_{\beta\gamma}$ para completar el ciclo (16,17). De esta manera las proteínas G actúan como interruptores moleculares biológicos con un papel crítico para las respuestas celulares a estímulos externos (Figura 3).

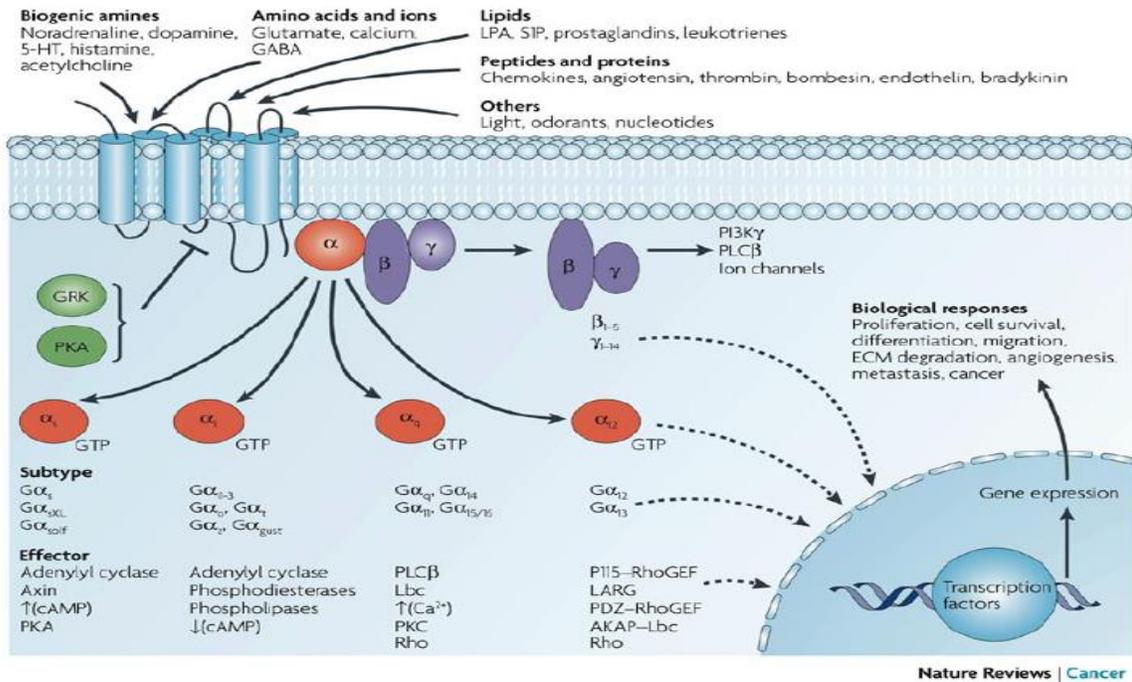


Figura 2. Representación esquemática de las vías de señalización inducidas por activación de los GPCRs (18).

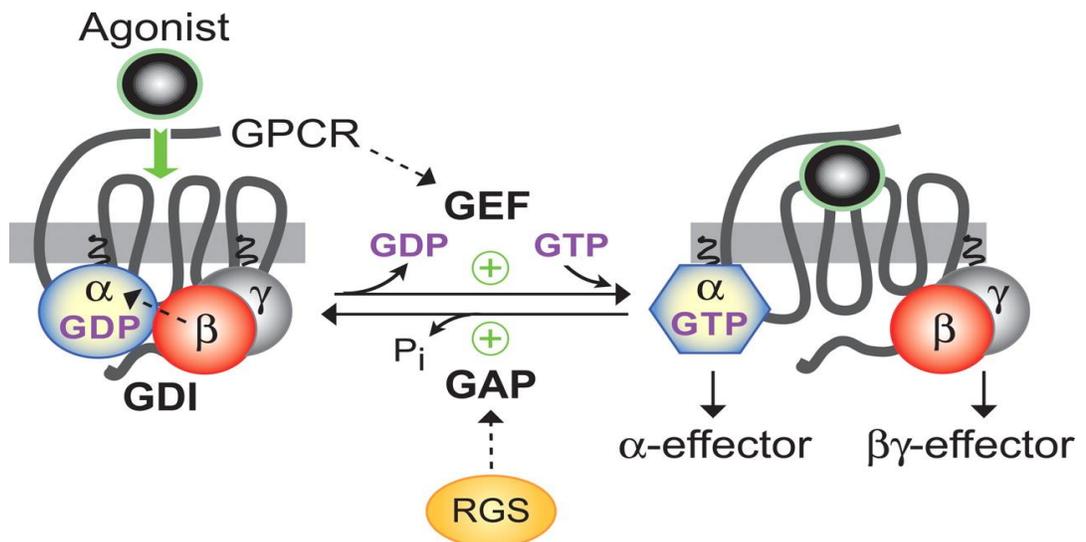


Figura 3. Ciclo de activación y desactivación de las proteínas G. (5).

1.1.3 Clasificación de los GPCRs

Los GPCRs se clasifican atendiendo a diferentes criterios como características funcionales o estructurales, el sitio de unión de ligandos, y características filogenéticas, entre otros. Con base en estos criterios se han desarrollado diversos sistemas de clasificación. En este trabajo se menciona la clasificación GRAFS (acrónimo formado por las iniciales de cada una de las familias) que agrupa a los GPCRs en 5 grandes familias, **G**lutamato, **R**odopsina, de **A**dhesión, **F**rizzled y **S**ecretina (20,18), que se muestran en la Figura 4:

1. Glutamato. Los miembros de esta familia poseen un dominio amino terminal extracelular de gran tamaño donde se localiza el sitio de unión de ligandos y este sitio contiene una región rica en cisteínas altamente conservada. En el dominio amino se forman dos lóbulos con una cavidad entre ellos en la que se une el glutamato. Se conocen 8 receptores metabotrópicos a glutamato (mGluRs); 2 receptores GABA_B (GABA_BR1, GABA_BR2); un receptor sensible a calcio (CASR), y cinco receptores que se consideran gustativos (TAS1).

2. Rodopsina. Es la familia más extensa de GPCRs, dividida en 4 grupos (α , β , γ , δ). Sus miembros tienen alta homología con la parte proteica (opsina) de la rodopsina, el primer GPCR cristalizado, una proteína transmembranal expresada en los discos de los bastones de la retina (21). Además, comparten la secuencia de aa NSxxNPxxY, conservada en el séptimo dominio transmembranal. La mayoría de los ligandos de estos receptores se unen a una cavidad formada por las regiones transmembranales, aunque existen excepciones, como los receptores para glicoproteínas (por ejemplo las hormonas luteinizante y folículo estimulante).

Grupo α . Este grupo se divide en 5 subgrupos o ramas principales: a) receptores a prostaglandinas, b) receptores a aminas, c) opsinas (sensores de la luz), d) receptores a melatonina, y e) receptores a melanocortina, canabinoides y adenosina.

Grupo β . Este grupo no tiene subdivisiones y se encuentra formado por 36 miembros que comprenden los receptores a colecistocinina, al neuropéptido Y, al neuromedina, a la hormona liberadora de la tirotrópina y a neurotensina.

Grupo γ . Dividido en 3 subgrupos o ramas: el subgrupo de receptores SOG (somatostatina, opioides y galanina); receptores a la hormona concentradora de melanina y receptores a quimiocinas.

Grupo δ . Se divide en 3 subgrupos: receptores relacionados con el oncogén MAS, receptores a glicoproteínas, y receptores a purinas y encargados percibir los olores.

3. Adhesión. Formada por 33 GPCRs; los miembros de esta familia están implicados en el proceso de adhesión celular y presentan un dominio amino terminal extracelular de gran tamaño (~200-2800 aa) que puede contener uno o varios motivos de adhesión, además de presentar un dominio GAIN que a su vez contiene un dominio GPS, un sitio de autoproteólisis.

4. Frizzled/taste2. Esta familia se divide en 2 tipos con diferencias importantes:

- Taste 2. Receptores para el sabor amargo tipo 2 (TAS2R); se conocen al menos 13 receptores de este tipo, presentan un extremo amino-terminal muy corto y no se conoce que exista un dominio de unión de ligandos en el mismo.
- Frizzled. Estos receptores controlan procesos de desarrollo embrionario, entre otros. Constituyen una familia de 10 receptores, y poseen un extremo amino terminal de ~200 aa con residuos de cisteína altamente conservados.

5. Secretina. Los miembros de esta familia comparten un dominio amino terminal de 60 a 80 aa con residuos de cisteína altamente conservados que permiten formar puentes disulfuros, esenciales para la unión del ligando. Algunos miembros de esta familia son el receptor a calcitonina, los receptores a la hormona liberadora de corticotropina, los receptores a glucagón y a péptidos similares al glucagón.

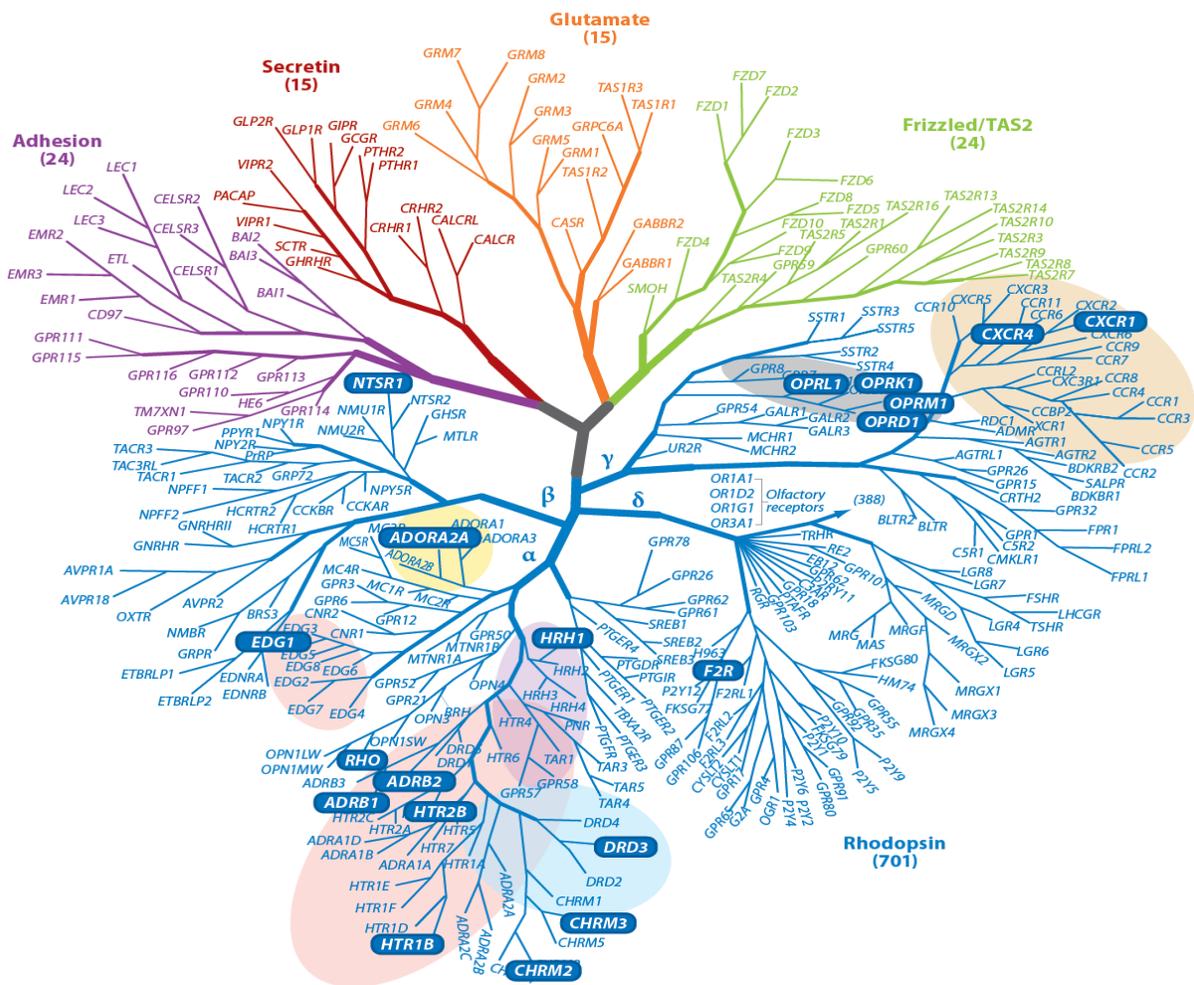


Figura 4. Clasificación de los GPCRs con base en su relación filogenética en el genoma humano. Se muestran las 5 familias de receptores propuestas por la clasificación **GRAFS**.

1.2 Latrofilinas

Las latrofilinas son GPCRs que pertenecen a la subfamilia de adhesión (aGPCRs) que tienen ~10,000 residuos, poseen un dominio amino terminal extracelular de gran tamaño que contiene un dominio de lectina, un dominio semejante a olfactomedina (*olfactomedin-like*), seguido de un dominio rico en serinas y treoninas, un dominio de unión a hormonas y un dominio GAIN que contiene a su vez un dominio GPS pequeño que representa un sitio de auto-escisión. Poseen

además 7 dominios transmembranales, y en la parte intracelular contienen un dominio carboxilo terminal que incluye un dominio PDZ, que actúa como un módulo de reconocimiento formado por ~90 aa con repetidos de la secuencia GVGF. El dominio PDZ puede interaccionar de forma homotípica con dominios PDZ de otras proteínas, y de forma heterotípica con la secuencia S/TXV del dominio carboxilo terminal de otras proteínas, modificando las vías de señalización intracelular (22,23). La representación esquemática se ilustra en la Figura 5. Las latrofilinas se han identificado como proteínas de unión a la α -latrotoxina, una potente toxina contenida en el veneno de la araña “viuda negra”, que promueve la liberación masiva de neurotransmisores como acetilcolina, noradrenalina y GABA, con lo cual este organismo paraliza a sus víctimas (47,48,22).

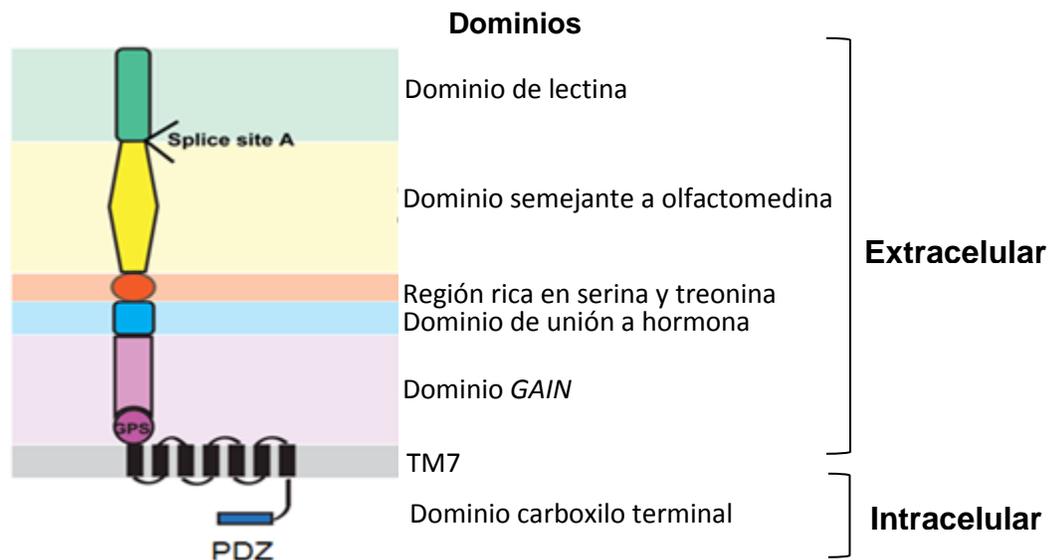


Figura 5. Modelo de la organización estructural de las latrofilinas, mostrando cada uno de sus dominios (56).

Estudios recientes basados en inmunotinción, microscopía electrónica y fraccionamiento celular indican que las latrofilinas se localizan en la membrana

pre-sináptica (6), y estudios de análisis del proteoma de la densidad post-sináptica y de fraccionamiento celular evidencian que se expresan también en la membrana post-sináptica (26,27). La unión de las latrofilinas a las proteínas que constituyen los andamios moleculares de la densidad post-sináptica también apoya la ubicación post-sináptica (27,28). Se conocen 3 tipos de latrofilinas (latrofilina-1, latrofilina-2 y latrofilina-3), codificadas por 3 genes diferentes (Lphn1, Lphn2 y Lphn3). Las latrofilinas 1 y 3 se expresan ampliamente en el Sistema Nervioso Central (SNC), mientras que la latrofilina-2 se expresa en forma ubicua (1,22).

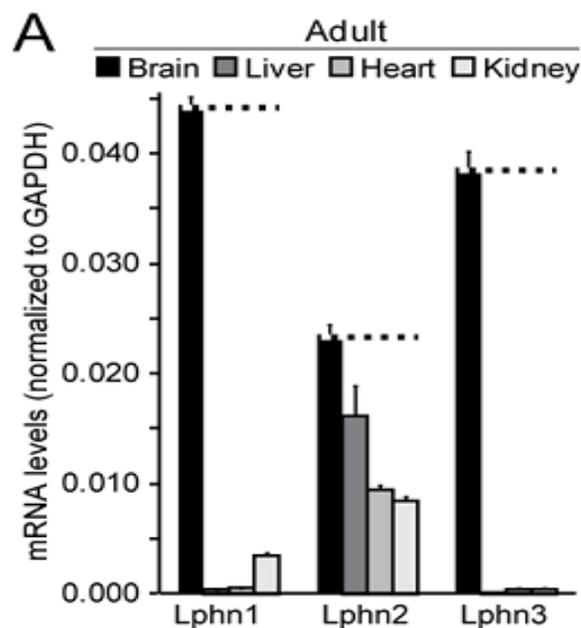


Figura 6. Expresión de las latrofilinas en el organismo. Cuantificación por RT-PCR del ARNm de latrofilina-1, latrofilina-2 y latrofilina-3 en cerebro, hígado, corazón y riñón (1).

Todas las latrofilinas contienen un sitio de procesamiento (*splicing*) alternativo en la secuencia del gen que corresponde a la región extracelular, y un segundo sitio en la secuencia que codifica la región intracelular, que pueden generar isoformas con funciones diferentes. El primer sitio se localiza entre las secuencias que codifican para los dominios semejantes a lectina y a olfactomedina, y el

procesamiento alternativo se ve reflejado en una ganancia de 5 aa para el caso de latrofilina-1 y latrofilina-3 (1,22,23,29), y de 4 ó 5 aa para la latrofilina-2, modificaciones importantes para la afinidad por ligandos. El segundo sitio se localiza entre la secuencia del gen que codifica para el séptimo dominio transmembranal y el dominio PDZ para la latrofilina-1, y resulta en una ganancia de 44 aa. En la latrofilina-2 y latrofilina-3 se encuentran dos sitios de procesamiento, el primero correspondiente a la tercera asa intracelular que conecta el quinto y sexto dominios transmembranales y resulta en una ganancia de 15 aa, y el segundo correspondiente al dominio carboxilo terminal citoplasmático y que resulta en una ganancia de 42 aa. En este último sitio la latrofilina-3 tiene dos regiones de procesamiento; la región A que resulta en una ganancia de 42 aa y la región B que genera un codón de paro (TAA) prematuro (22).

1.2.1 Relevancia de las latrofilinas en procesos fisiológicos y patológicos.

Los ratones con eliminación genética (*knockout*) de la latrofilina-1 muestran deterioro en la capacidad de respuesta a α -latrotoxina, y la incapacidad de la madre de cuidar a sus crías (30), lo que sugiere que las latrofilinas pueden ser funcionalmente no redundantes en los vertebrados.

En estudios con *Drosophila melanogaster knockout* de la latrofilina se ha observado que esta proteína es requerida en las neuronas cordotonaes para una adecuada sensibilidad al tacto suave y la retroalimentación propioceptiva durante la locomoción de las larvas, indicando una nueva función de la latrofilina en el reconocimiento de los estímulos mecanosensoriales (58).

En *C. elegans* se expresan dos tipos de latrofilinas, latrofilina-1 y latrofilina-2; de éstas, la latrofilina-1 es indispensable para la alineación de los planos anterior y posterior en la división celular durante el desarrollo, por lo que se le ha relacionado con la reproducción (23, 31).

En el corazón de embriones de pollo se ha mostrado que la latrofilina-2 tiene una función importante en el proceso de formación del epitelio mesenquimal de las válvulas cardíacas (32).

Por otra parte, a las variantes genéticas del gen *Lphn3* se les ha considerado como factores de susceptibilidad para el desarrollo del déficit de atención e hiperactividad (TDAH), tanto en niños como en la edad adulta (33, 34). Una región crítica mínima de aproximadamente 325 kb, identificada como un *locus* de susceptibilidad a TDAH en estudios de asociación, fue asignada a los exones 4-19 del gen *Lphn3* que codifican la mayor parte de la proteína traducida, y los estudios de *knockout* de la latrofilina-3 en ratones revelaron cambios en el RNAm de los transportadores de dopamina (DAT) y serotonina (SERT) en recién nacidos y en los niveles estriatales de dopamina y de serotonina en la edad adulta (35).

A las mutaciones en los genes que codifican para las latrofilinas se les ha relacionado también con el cáncer. Inicialmente *Lphn2* y *Lphn1* fueron aislados y caracterizados en un estudio destinado a la identificación de genes comprendidos en una región cromosómica implicada en el cáncer de mama humano (36). Sin embargo, la función de *Lphn* en el ciclo celular aún no está clara, pero su implicación en la división celular asimétrica resalta en la embriogénesis de *C. elegans* (31). En los linajes celulares con mutaciones específicas de *Lphn* los husos mitóticos no se alinean correctamente durante las etapas específicas de la división de blastómeros, conduciendo a la pérdida de la polaridad del tejido. Lo anterior implica que el proceso depende del acople de la adhesión celular a la señalización del receptor latrofilina, que la señalización intracelular de la latrofilina depende del contacto célula-célula y que se requiere para la sincronización con otras células para las divisiones mitóticas normales, un proceso que se reprime en la inducción de cáncer (37).

1.2.2 Ligandos de las latrofilinas.

Los ligandos endógenos para la latrofilina son las teneurinas (ten 1-4), las neurexinas (α y β) y las proteínas transmembranales con repetidos ricos en lectina y fibronectina, FLRT 1-3 (25,38).

1.2.2.1 Teneurinas. Son proteínas transmembranales glicosiladas tipo II de ~2800 residuos, que forman heterodímeros mediante puentes disulfuro; tienen una región amino terminal citoplasmática relativamente corta, una región transmembranal única (TMR), un dominio carboxilo terminal extracelular largo que contiene ocho repeticiones de la secuencia EGF, y una región conservada con 17 cisteínas seguida de 8 repeticiones de la secuencia YD (1,39,40) (Figura 7). La relevancia de estas proteínas ha sido evidenciada por datos que muestran que la supresión de teneurina-3 en ratones altera la guía axonal en el sistema visual y por ende induce una inadecuada focalización de los axones de las neuronas que proyectan de la retina al núcleo geniculado y al colículo superior (41,42). La supresión de la teneurina-4 afecta la diferenciación de los oligodendrocitos y la mielinización en el SNC (43). Lo anterior implica que en el sistema nervioso las teneurinas participan en la promoción del crecimiento de neuritas, la adhesión celular, la morfología dendrítica y la formación de sinapsis.

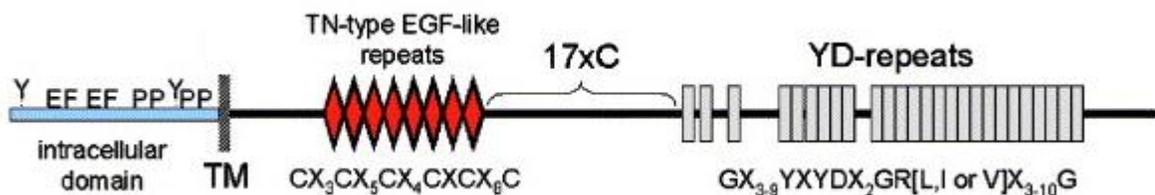


Figura 7. Estructura de los dominios de las teneurinas (40).

Aunque la función de la mayoría de las teneurinas en la adhesión celular todavía no está clara, la formación de sinapsis *in vitro* parece estar mediada por sus interacciones heterofílicas con las latrofilinas (25,44). En experimentos en neuronas de hipocampo de ratón se ha observado que las proteínas latrofilina-1 y

teneurina-2 se encuentran primordialmente en la sinapsis, y que la latrofilina-1 está localizada en las membranas pre-sinápticas mientras que la teneurina-2 se localiza principalmente de manera post-sináptica, lo que sugiere que pueden formar complejos trans-sinápticos para regular la formación y/o el mantenimiento de las sinapsis (25).

1.2.2.2 Neurexinas. Otros ligandos del receptor latrofilina son las neurexinas, que al igual que las teneurinas son proteínas de un solo paso transmembranaral, pero que se expresan en la membrana pre-sináptica. Las neurexinas son codificadas por 3 genes homólogos (nrxn 1-3) que dan origen a dos isoformas principales, α -neurexina (isoforma larga) y β -neurexina (isoforma corta) (45). La β -neurexina presenta mayor afinidad por la latrofilina-1 (46). Tanto la α -neurexina como la β -neurexina poseen el mismo dominio amino terminal intracelular corto y un solo dominio transmembranaral, pero la región carboxilo terminal extracelular de la α -neurexina contiene 6 repetidos de la secuencia de aa LNS y 3 repetidos de la secuencia EGF, mientras que la β -neurexina sólo contiene un repetido de la secuencia LNS (Figura 8).

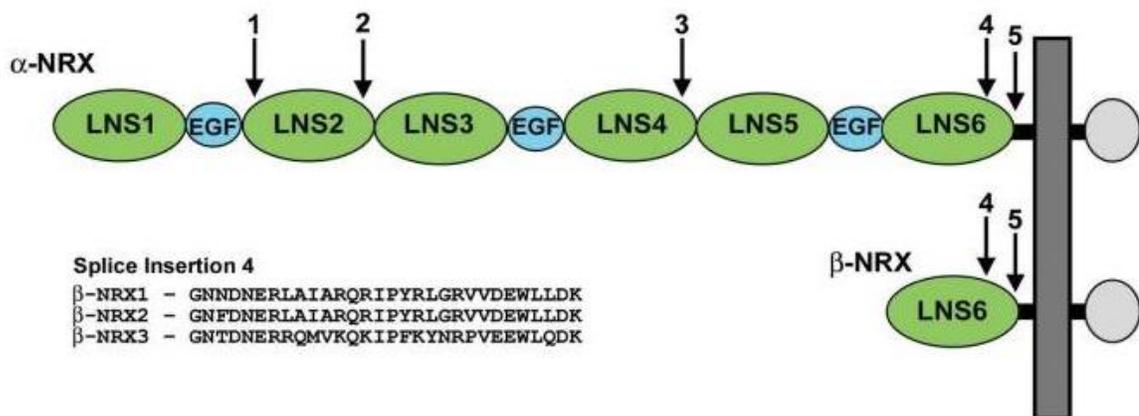


Figura 8. Esquema de la organización estructural de los dominios de la α -neurexina y de la β -neurexina. Las flechas indican los sitios de procesamientos alternativos (45).

La β -neurexina, al igual que las latrofilinas, es un receptor para la α -latrotoxina, que promueve la liberación masiva de neurotransmisores independiente de exocitosis en las terminales nerviosas (22,44,47,48). En estudios con solubilizados de cerebro de la rata, mediante la técnica de cromatografía de afinidad y utilizando α -latrotoxina se obtuvieron dos bandas, una correspondiente a neurexina.

Las neurexinas son susceptibles a un gran número de eventos de procesamiento alternativo, que pueden generar más de 3,000 isoformas con funciones diferentes, lo que las convierte en proteínas polimórficas (45). La α -neurexina está sujeta a 5 formas de procesamiento alternativo (ES1-ES5) que pueden generar ~3,000 isoformas diferentes, y la β -neurexina posee 2 formas de procesamiento alternativo (ES4, ES5), que generan más de 1,800 isoformas, con el sitio ES4 regulando la interacción con las latrofilinas. La importancia de las neurexinas ha sido evidenciada por datos que muestran que la unión latrofilina-neurexina estabiliza las uniones célula-célula en una configuración *trans*, aunque es posible una unión en *cis* por la presencia conjunta de latrofilinas y neurexinas en la membrana pre-sináptica. Debido a que ambas proteínas unen α -latrotoxina, es posible que de manera conjunta la latrofilina-1 y las neurexinas desencadenen la acción de la α -latrotoxina. Este efecto cooperativo entre neurexina-1 y latrofilina-1 se ha observado en ratones *knockout* de dichas moléculas de adhesión (27).

1.2.2.3 FLRTs. Son proteínas transmembranales glicosiladas que se localizan en la membrana post-sináptica y que en su región carboxilo terminal extracelular contienen un dominio fibronectina tipo III, seguido de 10 repeticiones ricas en leucina flanqueadas por una cisteína, un dominio transmembranal y un dominio amino terminal intracelular corto (Figura 9). Existen 3 isoformas de FLRT, codificadas por 3 genes diferentes (Flrt1-3), que se expresan de manera ubicua (50). En el sistema nervioso, las FLRTs habían sido involucradas en diversos procesos, pero hasta hace poco se mostró que FLRT3 participa en la formación de complejos trans-sinápticos mediante su interacción con la latrofilina-1 y la latrofilina-3 (1,50). Además, se ha observado que las FLRTs desempeñan un

papel importante en el desarrollo de las sinapsis glutamatérgicas y la regulación del número de sinapsis excitatorias *in vitro* e *in vivo* (35).



Figura 9. Representación esquemática de la estructura y organización de los dominios de la FLRT-3 (15).

Las FLRTs también pueden unirse a los receptores de guía axonal Unc5B y Unc5d, lo que promueve el direccionamiento axonal durante la formación y el establecimiento de las sinapsis (52,53). Además, están implicadas en la señalización del factor de crecimiento fibroblástico y la adhesión celular durante el desarrollo (1,51,54). Estudios recientes han mostrado que FLRT2 y FLRT3 son esenciales para el desarrollo embrionario y probablemente necesarias para el desarrollo normal del tejido cardíaco (54, 55). En conjunto, la información anterior indica que la latrofilina es una molécula de adhesión que interactúa trans-sinápticamente con teneurinas, neurexinas y FLRTs.

2. Justificación

Algunas moléculas de adhesión celular tienen relevancia en la conectividad neural y la latrofilina-1 se ha descrito como un receptor acoplado a proteínas G de la subfamilia de receptores a moléculas de adhesión celular. Por la similitud estructural que tiene con los miembros de esta familia, también se ha evidenciado su localización pre- y post-sináptica, y que interacciona con la teneurina-2 y con FLRT3, que se expresan en la membrana post-sináptica, y con la neurexina 1 β , expresada en la membrana pre-sináptica.

La teneurina-2, la neurexina 1 β y la FLRT3 son proteínas que tienen un papel importante en la formación y el desarrollo de la sinapsis, por lo que a través de las interacciones con estas proteínas la latrofilina-1 podría estar mediando la formación, el mantenimiento y la especificidad sináptica a través de la señalización intracelular generada por su activación.

A la fecha no se ha descrito si el receptor latrofilina-1 está acoplado a proteínas G y por consiguiente no se ha establecido si su activación induce un mecanismo de señalización intracelular.

Por lo anterior, en este trabajo se plantea obtener ligandos solubles sintéticos del receptor latrofilina-1 y comprobar la expresión de este receptor en un sistema heterólogo, para en una fase posterior realizar ensayos funcionales que permitan determinar en primer instancia si el receptor latrofilina-1 se encuentra acoplado a proteínas G, y de ser así, establecer el tipo de proteína G.

3. Hipótesis

La hipótesis general del proyecto es:

La activación del receptor latrofilina-1 inducida por ligando endógenos (teneurina-2, neurexina 1 β , FLRT3) modifica los niveles de AMPc por acople a proteínas G α s o G α i/o ó bien aumenta la concentración de calcio intracelular por acople a proteína G α q11.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

El objetivo general del proyecto es:

Determinar la vía de señalización intracelular inducida por la activación del receptor latrofilina-1, utilizando un sistema de expresión heterólogo.

Para la primera fase del proyecto era necesario obtener ligandos solubles sintéticos de la latrofilina-1 y comprobar la expresión de este receptor en un sistema heterólogo, para en una fase posterior realizar ensayos funcionales que permitan determinar la vía de señalización intracelular inducida por la activación de la latrofilina-1. Por lo tanto, para la fase de maestría los objetivos específicos fueron los siguientes

4.2 Objetivos específicos

1. Diseñar estrategias moleculares para inducir la expresión en un sistema heterólogo de formas solubles de los ligandos endógenos (neurexina1 β , teneurina-2 y FLRT3) del receptor latrofilina-1.
2. Obtener y purificar los ligandos sintéticos generados en un sistema heterólogo.
3. Optimizar la expresión heteróloga del receptor latrofilina-1.

5. Materiales y métodos

5.1 Generación de vectores de expresión

A partir de plásmidos ya generados en el laboratorio, se obtuvieron nuevas construcciones que permiten expresar los ligandos endógenos solubles del receptor latrofilina-1. Los ligandos solubles corresponden la región extracelular de teneurina-2, neurexina 1 β y FLRT3, y para una purificación eficiente a los ligandos se les insertó al final la secuencia de nucleótidos gagaacctttatttccagggc que codifica la secuencia de aa ENLYFQG, consenso para la enzima TEV, seguida de una secuencia de nucleótidos que codifica para la fracción constante (Fc) de la IgG, útil para la purificación de estos ligandos y la realización de inmunoensayos.

5.1.1 Generación del vector IgG a partir de pCMV Ig Bai 3.2

Partiendo del plásmido pCMV Ig Bai 3.2 que contiene un fragmento del inhibidor de la angiogénesis específico 3 de cerebro humano (Bai 3) y la Fc-IgG, se generó el vector IgG (pCMV IgG). El plásmido pCMV-Ig-Bai 3.2 fue restringido con las enzimas Mlu1 y Sal1 para generar los mismos sitios de corte de los amplicones que se insertaron, y que permitieron además retirar a Bai 3, quedando la secuencia de nucleótidos que codifican para la Fc-IgG.

5.1.2 Generación de la teneurina-2 soluble. Se partió del plásmido pcDNA3 LassoB-Flag-Myc que contiene un péptido señal, seguido de un epitopo (Flag), seguido a su vez de la secuencia extracelular de la teneurina-2 (*Synthetic construct Loss-B gene complete CDS*), que al final contiene un epitopo c-myc. Con oligonucleótidos específicos se amplificó por PCR de punto final la región del plásmido que contiene el péptido señal, el epitopo FLAG, la región extracelular de teneurina-2 (A37-G240, que corresponde a la región del gen), insertándole en el extremo 5' del amplicón una secuencia de reconocimiento para Mlu1 y en el extremo 3' la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aa consenso para TEV y la secuencia de nucleótidos de reconocimiento por Sal1. De esta

manera se generó el fragmento Mlu1-Sal1 de 7236 pb, que fue insertado en el plásmido vector pCMV IgG.

5.1.3 Generación de neurexina 1- β soluble. Se partió del plásmido pCMV N1 β -1 Flag que contiene un epitopo (Flag) y la secuencia completa de neurexina 1- β (*Mus musculus*). Se realizó PCR de punto final utilizando oligonucleótidos que flanquean la región del plásmido que contiene el péptido señal, el epitopo FLAG, la región extracelular de neurexina 1 β (A47-E268 en la secuencia del gen) y que además permitieron insertar en el extremo 5' del amplicón el sitio de reconocimiento para Mlu1 y en el extremo 3' la secuencia de nucleótidos que codifica para para la secuencia de aa consenso para la enzima TEV, seguido de una secuencia de corte que reconoce Sal1, obteniendo un amplicón de 788 pb (fragmento Mlu1-Sal1). El fragmento se insertó en el mismo vector (pCMV IgG) que se usó para la generación del nuevo constructo de teneurina-2 soluble.

5.1.4 Generación de FLRT3 soluble. Se realizó la misma estrategia molecular, pero partiendo del plásmido pDisplay FLRT3 que contiene un péptido señal, un epitopo hemaglutinina (HA) y la secuencia completa de FLRT3 (*Homo Sapiens*). Se amplificó la secuencia de aa S30-L529 que corresponde a la secuencia del gen, obteniendo un amplicón Mlu1-Sal1 de 1649 pb, que posteriormente se insertó en el vector pCMV IgG para generar la nueva construcción.

5.2 PCR de punto final

Para los ensayos de PCR de punto final se utilizó un *kit* de la enzima PrimeSTAR HS DNA polimerasa (Takara, R010A). En la Tabla 1 se muestran los componentes de las reacciones y en la Tabla 2 se muestran las condiciones de temperatura y tiempo empleadas en cada ciclo de la reacciones de PCR de punto final.

5.3 Ensayos de ligación

Una vez que se obtuvieron los amplicones que corresponden a la región extracelular de teneurina-2, neurexina 1- β y FLRT-3, así como el plásmido vector, se purificaron las bandas utilizando el *kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up*

System. Se restringió con las enzimas Mlu1 y Sal1, y se purificó nuevamente con el kit. Se calcularon las relaciones 3:1 de las cantidades de ADN del plásmido vector y del ADN inserto a ser utilizados para dicha reacción, con la ecuación $ng\ inserto = \frac{(ng\ vector)(Kb\ inserto)}{Kb\ vector} \times \frac{3}{1}$. En seguida se prepararon las reacciones de ligación en un volumen de 10 μ l utilizando la enzima T4 ligasa (Promega) y se incubó durante 16 h a 16°C. Se tomaron 5 μ l de la reacción de ligación con los que se transformaron células competentes (bacterias *E. coli* DH5- α) utilizando el método de choque térmico con el fin de amplificar la nueva construcción plasmídica. Las bacterias fueron sembradas en agar/LB conteniendo 100 μ g/ml de ampicilina para seleccionar las colonias que incorporaron el plásmido, ya que el vector contiene el gen de resistencia a ampicilina.

Tabla 1. Componentes de las reacciones de PCR.

Componentes	Cantidad (μ l)
Solución amortiguadora de la enzima	5
DNTPs (10 mM)	2
DNA molde (100 pg)	1
Oligonucleótido <i>Forward</i> (10 μ M)	0.5
Oligonucleótido <i>Reverse</i> (10 μ M)	0.5
DMSO	1.25
Enzima	0.1
H ₂ O	14.65

Tabla 2. Condiciones empleadas en las reacciones de PCR.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización	98	3 min
Desnaturalización	98	10 s
Alineamiento	55	5 s
Elongación	68	1 min x Kb
	40 ciclos	

5.4 Extracción y purificación de ADN plasmídico

5.4.1 Extracción de ADN plasmídico

Una colonia de bacterias *E. coli* DH5- α que creció en el medio de selección y que presumiblemente incorporó el plásmido de interés fue sembrada en un tubo de ensayo estéril conteniendo 1 ml de medio de cultivo LB/ampicilina (100 μ g/ml), incubando a 37°C con agitación vigorosa (225 *rpm*) durante 8 h. Se tomaron 100 μ l de la suspensión de bacterias que fueron sembrados en un matraz Erlenmeyer de 1 l conteniendo 100 ml de medio LB/ampicilina (100 μ g/ml). Después de incubar a 37°C durante 16 h con agitación (225 *rpm*), la suspensión bacteriana fue colocada en un tubo de policarbonato de 50 ml y se centrifugó a 7,500 *rpm* durante 12 min a 4°C para sedimentar las bacterias. La pastilla fue resuspendida en 3 ml de solución 1 (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0) con agitación vigorosa (vórtex); se agregaron 450 μ l de solución de lisozima (10 mg/ml en Tris-HCl 10 mM, pH 8.0) y se agitó nuevamente antes de agregar 6 ml de solución 2 (0.2 N NaOH, 1% SDS) y agitar nuevamente. Se agregaron 6 ml de cloroformo y 3 ml de solución 3 (3 M KCH₃CO₂, 11.5% ácido acético) y se agitó nuevamente. La mezcla fue incubada a 0°C durante 10 min para posteriormente ser centrifugada a 5,000 *rpm* durante 12 min a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y se adicionó 0.6 veces el volumen de isopropanol al 99.6%; se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y se centrifugó a 5,000 *rpm* durante 15 min a temperatura ambiente. La pastilla obtenida fue lavada con 2 ml de etanol al 70% antes de ser disuelta en 450 μ l de solución amortiguadora TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) y el volumen fue transferido a un tubo Eppendorf de 2 ml.

5.4.2 Purificación del ADN plasmídico

A la muestra de ADN se le adicionó un volumen igual de LiCl (5 M), se agitó vigorosamente y se centrifugó a 10,000 *rpm* durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se agregó un volumen igual de isopropanol al 99.6% incubando a 22°C durante 10 min, antes de centrifugar a 13,000 *rpm*

durante 10 min a 4°C. La pastilla resultante fue lavada con 1 ml de etanol al 70% y después fue disuelta en 500 µl de solución amortiguadora TE (pH 8.0) conteniendo RNasa (20 µg/ml) para incubar a 22°C durante 30 min. Posteriormente se adicionaron 500 µl de una solución al 13% de polietilenglicol (8,000) en 1.6 M de NaCl y se incubó a -20°C durante 20 min antes de centrifugar a 13,000 rpm durante 15 min a 4°C. La pastilla resultante fue disuelta en 500 µl de solución amortiguadora TE (pH 8.0), y se realizaron 2 lavados con igual volumen de fenol y cloroformo, respectivamente, recuperando la fase acuosa en cada lavado. Esta fase fue transferida a un tubo nuevo, y se adicionaron 100 µl de acetato de amonio (10 M) y 2 veces el volumen de etanol al 99.6%; se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min, la pastilla resultante fue lavada con 2 ml de etanol al 70% y se disolvió en 150 µl de TE (pH 8.0). La cantidad de ADN plasmídico se cuantificó con el equipo NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

5.5 Transfección celular por el método de PEI (polietilenimina)

5.5.1 Preparación de la PEI

En un tubo de policarbonato estéril de 50 ml se colocaron 25 mg de PEI (P.M. 25,000) de cadena lineal y se aforó a 25 ml con solución amortiguadora de fosfatos (PBS; pH 4.5), para disolver en baño maría (70-80°C) y agitación vigorosa en vórtex. La solución resultante se filtró a través de membranas SFCA (acetato de celulosa libre de surfactante) con poros de 0.22 µM a fin de esterilizarla (57).

5.5.2 Transfección

Las células HEK 293T fueron sembradas en cajas de 6 pozos con medio DMEM conteniendo 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de una mezcla de antibióticos (penicilina 10,000 U/ml; estreptomina 10,000 µg/ml). La transfección se realizó una vez que las células alcanzaron el 80-90% de confluencia (~700,000 células). En un tubo Eppendorf de 1.5 ml se mezclaron 420 µl de DMEM, 7 µg de DNA plasmídico y 35 µl de PEI (1 mg/ml) con una relación ADN:PEI de 1:5, y se incubó por 30 min a 22°C. Transcurrido el tiempo de incubación se aforó a 1 ml con DMEM, se retiró el medio del cultivo celular, las células se lavaron con solución

amortiguadora de fosfatos (PBS; pH 7.4), y se agregó el complejo PEI-DNA. Se incubó a 37°C por 30 min en una atmósfera de 5% CO₂/95% O₂, después de lo cual se agregó 1 ml de DMEM/20% de SFB, para que la concentración final de SFB fuera 10%, y se continuó la incubación por 24 ó 48 h.

5.6 Transfección por el método de fosfato de calcio

Las células HEK-293 se sembraron en cajas de Petri de 10 cm de diámetro con medio DMEM conteniendo 10% de SFB y 1% de antibióticos. Una vez alcanzado el 80-90% de confluencia, se cambió el medio de cultivo por 10 ml de DMEM/FBS (10%) conteniendo 25 mM de cloroquina y se incubó por 3 h en una atmósfera de 5% CO₂/95% O₂. En un tubo Eppendorf (A) se mezclaron 30 µg de ADN plasmídico, 62 µl de CaCl₂ (2 M) y se aforó a 500 µl con H₂O. En otro tubo Eppendorf (B) se colocaron 500 µl de solución HBS (2X; 1.6 g NaCl, 0.074 g KCl, 0.0402 g Na₂HPO₄·7H₂O, 1 g HEPES y 0.2 g D-glucosa por cada 100 ml; el pH se ajustó a 7.05 con NaOH). La mezcla del tubo A se transfirió al tubo B gota a gota mientras se agitaba suavemente (vortex). La mezcla resultante se añadió inmediatamente a las células gota a gota y de manera uniforme sobre toda la caja. Se incubó de 72 a 96 h a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂/95%O₂, y cuando el medio se tornó amarillo (~48 h post-transfección) se neutralizó la acidez del medio agregando 450 µl de una solución de HEPES (1 M, pH 7.9; concentración final 43 mM).

5.7 Producción y purificación de ligandos sintéticos

Para generar la expresión de ligandos etiquetados con la Fc-IgG se siguieron los métodos descritos en las referencias 1 y 46. Las células HEK 293T se sembraron en placas de 10 cm de diámetro y una vez que alcanzaron el 80-90% de confluencia se transfectaron con el método de fosfato de calcio. El medio de cultivo que contiene los ligandos solubles fue recuperado 4 días después de la transfección en tubos de policarbonato de 50 ml y se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se recuperó y se ajustó el pH a 7.4 con una solución (10 mM) de HEPES (pH 7.4), se adicionaron

inhibidores de proteasa (AEBSF 2 mM, aprotinina 0.3 mM, bestatina 130 mM, EDTA 1 mM, E-64 14 mM, leupeptina 1 mM) con una dilución 1:100 y se incubó durante 24 h a 4 °C con agitación suave en presencia de perlas de sefarosa unida a proteína A (100 µl), que tiene alta afinidad por la Fc-IgG. Una vez transcurrido el tiempo de incubación la mezcla se centrifugó a 5,000 rpm durante 5 min para separar el complejo perlas de sefarosa/proteínas del sobrenadante. Las perlas se lavaron 3 veces con 1 ml de PBS (pH 7.4, 4°C) al que se le agregaron 50 mM de NaCl. Se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min para eliminar las proteínas no unidas, y la pastilla obtenida se resuspendió en PBS (4 °C). Para separar los ligandos de la proteína A unida a las perlas de sefarosa, la suspensión se colocó en columnas de *pyrse* (con filtro de fibra de vidrio) y se centrifugó por 5 s a 5,000 rpm para retirar el PBS. Para eluir las proteínas las perlas fueron resuspendidas en una solución HEPES (10 mM, pH 7.4) conteniendo 4 M de MgCl₂ (3 veces del volumen de las perlas) incubando 8 min y centrifugando 5 s a 5,000 rpm (4°C). Este procedimiento se repitió 4 veces recuperando los eluados, los cuales se colocaron en una columna del kit Amicon® Ultra-0.5 (Centrifugal Filter Devices) con poro de 50 kDa, para ultrafiltración. Para eliminar el MgCl₂ y purificar los ligandos, el volumen remanente (~50 µl) se diluyó (1:1000000) con una solución amortiguadora (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4). Se cuantificó la cantidad de proteína obtenida por electroforesis (80 V, 25 min; 120 V, 70 min) en un gel de poliacrilamida al 8% en el cual se cargaron concentraciones conocidas de albúmina.

5.8 Tinción con azul de Comassie

Después la electroforesis el gel fue colocado en un recipiente agregando solución de azul de Comassie (0.25% azul de Comassie, 50% metanol, 10% ácido acético), el cual se colocó en un horno de microondas sometiénolo a un pulso de 25 s. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 40 min en agitación suave antes de retirar la solución de tinción y lavar con H₂O destilada. Se colocó solución 1 de desteñido (50% etanol y 10% ácido acético) y se le dio un pulso de 25 s en el horno de microondas. Se incubó a temperatura ambiente durante 10 min en

agitación suave, este paso se repitió, se retiró la solución de desteñido, se lavó con H₂O destilada, se agregó la solución 2 de desteñido (10% etanol, 5% ácido acético) y se aplicó un pulso de 25 s en el horno de microondas. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche en agitación suave.

5.9 Ensayos de inmunodetección (Western Blot).

5.9.1 Extracción de proteínas transmembranales.

Después de la transfección de células HEK 293T con el receptor latrofilina-1 utilizando el método de PEI (48 h), se retiró el medio y las células se lavaron con PBS, antes de incubar a -80°C por 30 min, y a 37 °C por 30 s. Posteriormente se incubó en hielo 1 min antes de agregar 200 µl de PBS conteniendo 0.1% de BSA, para levantar las membranas celulares raspando el fondo del pozo. La suspensión obtenida se pasó a tubos Eppendorf de 1.5 ml, y se centrifugó a 5,000 rpm durante 5 min. La pastilla fue resuspendida en 200 µl de solución de lisis IP (0.1% Tritón X-100, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA) conteniendo inhibidores de proteasas para incubar a 4°C durante 2 h.

La muestra se centrifugó a 13,000 rpm durante 30 min, y el sobrenadante que contiene las proteínas transmembranales fue recuperado para ser analizado mediante ensayos de Western Blot.

5.9.2 Extracción de proteínas totales (método directo).

Después de la transfección celular como se describe arriba, se retiró el medio y las células se lavaron con PBS, antes de ser incubadas a -80 °C por 30 min, y a 37 °C por 30 s. Se incubó en hielo por 1 min antes de agregar 200 µl de solución amortiguadora de carga (50mM Tris-HCl, pH 6.8, 20 mM ditiotreitol, 0.4% SDS, 0.1% azul de bromofenol, 10% glicerol). Las muestras fueron raspadas y resuspendidas 10-15 veces con agujas de insulina, antes de incubar a 37°C durante 30 min. Se tomaron 50 µl de la muestra que fueron cargados en gel de poliacrilamida al 8% para la electroforesis.

5.9.3 Western Blot

Las muestras (30-100 µg de proteína) se mezclaron con solución amortiguadora de carga (5X; 250 mM Tris-HCl, pH 6.8, 100 mM ditioneitol, 2% SDS, 0.5% azul de bromofenol, 50% glicerol), para un volumen final de 50 µl. Se incubó a 37°C durante 30 min antes de la electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% (25 min a 80 V, 70 min a 120 V). Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa utilizando cámara húmeda a 25 V durante 16 h en una solución que contiene 25 mM Tris-HCL, 250 mM glicina y 0.1% SDS. La membrana fue teñida con rojo de Ponceau para verificar la presencia de proteínas, y lavada 3 veces con solución TBST (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM NaCl, 0.1% Tween) en agitación suave durante 10 min cada lavado. Se bloqueó con solución TBST conteniendo 5% de leche descremada durante 1 h a temperatura ambiente antes de incubar con el anticuerpo primario durante 20 h a 4°C. La membrana fue lavada 3 veces con TBST durante 10 min con agitación suave, antes de incubar con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (1 h, 22°C). La membrana fue lavada 3 veces con TBST durante 10 min en agitación suave.

5.9.4 Revelado

La membrana fue colocada en una placa de acetato y se colocó luminol como sustrato quimioluminiscente de la peroxidasa de rábano incubando a temperatura ambiente por 45 s. En la oscuridad se colocó encima de ella una película fotostática (Kodak) exponiendo por 1, 4, 7 y 10 min para obtener el mejor revelado posible. La película fotostática fue colocada en solución de revelado (Agfa) y lavada con agua de la llave una vez que aparecieron las bandas producto del revelado. Posteriormente se colocó en solución fijadora de la misma marca y se lavó con agua de la llave antes de secar a temperatura ambiente.

6. Resultados

6.1 Generación de vectores de expresión

6.1.1 Restricción enzimática. Con el objetivo de comprobar la identidad de las construcciones plasmídicas que contienen la secuencia completa de las proteínas transmembranales neurexina 1 β , teneurina-2 y FLRT3 (ligandos endógenos del receptor latrofilina-1), las mismas se restringieron con enzimas específicas. Se restringió también el plásmido vector y los plásmidos que contienen las tres isoformas (Lphn-1, Lphn-1 Δ A, Lphn-1 Δ A Δ B) del receptor latrofilina-1. Las Figuras 10, 11 y 12 muestran el resultado de las restricciones.

- a) El plásmido que contiene la secuencia extracelular de la teneurina-2 (pcDNA3 LassoB-Flag-Myc) se restringió con las enzimas Bgl II y Xba I, que generaron 8 fragmentos de 4453, 3037, 2135, 1052, 1050, 648, 233 y 53 pb (figura 10 A).
- b) El plásmido pCMV-N1 β -1Flag, que contiene la secuencia completa de neurexina 1 β , se restringió con las enzimas XbaI y SalI, generando 2 fragmentos de 827 y 511 pb.
- c) El plásmido pDisplay-FLRT3, que contiene la secuencia completa de FLRT3, se restringió con las enzimas EcoRI y Xho I, generando 4 fragmentos de 4974, 1082, 538 y 208 pb.
- d) El plásmido pCMV-IG-Bai-3.2, que se usó como vector para la obtención de los constructos finales de expresión de los ligandos solubles, se restringió con las enzimas Sal I y Mlu I, las cuales generaron 2 fragmentos de 5936 y 2271 pb.
- e) El plásmido pCMV-CL1-HA contiene la isoforma Lphn-1 Δ A Δ B, sin la secuencia ganancia extracelular (5aa), ni la secuencia de ganancia intracelular (44 aa) como producto de la forma de procesamiento alternativo; este

plásmido fue restringido con las enzimas Bgl II y Xho I, generando 3 fragmentos 3242, 1296 y 1023 pb.

- f) El plásmido pCMV-CL1-AB contiene la isoforma Lphn-1 Δ A del receptor latrofilina-1 y que no contiene la secuencia de ganancia extracelular (secuencia de 5 aa), pero si la secuencia ganancia intracelular (secuencia de 44 aa); este plásmido restringió con las enzimas Bgl II y Xho I, generando 3 fragmentos de 3374, 1296 y 1023 pb.
- g) El plásmido pCMV-CL1-BB contiene la isoforma Lphn-1 del receptor latrofilina-1 que contiene la secuencia de ganancia extracelular (5 aa) y la secuencia de ganancia intracelular (44 aa). Este plásmido se restringió con las enzimas BgIII y Xho1 y se generaron 4 fragmentos de 3834, 3808, 1299 y 1022 pb.

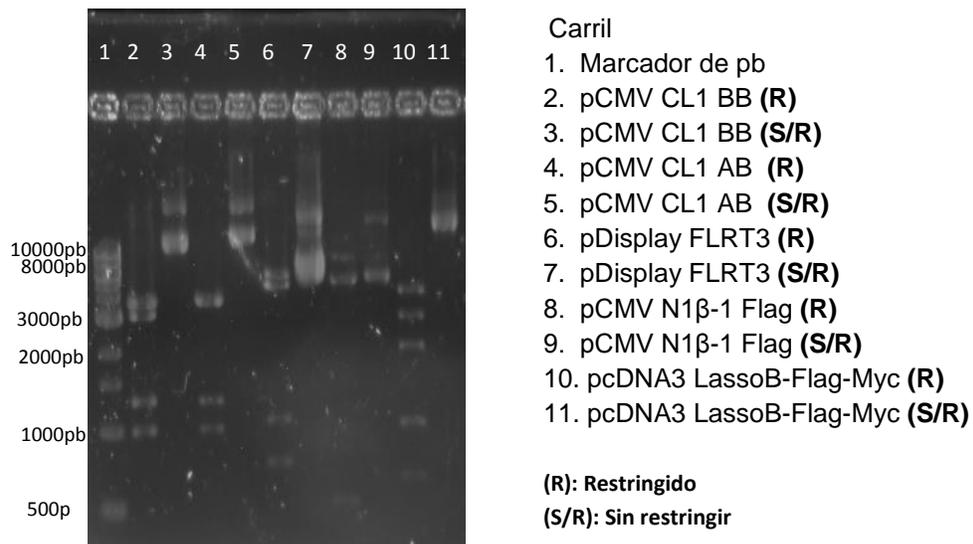


Figura 10. Análisis de restricción de los plásmidos de interés. Se analizaron los plásmidos que contienen las dos isoformas (Lphn-1, Lphn-1 Δ A) del receptor latrofilina-1 (carriles 2-4), y los ligandos endógenos de secuencia completa (neurexina 1 β , FLRT3, teneurina-2; carriles 6-11).

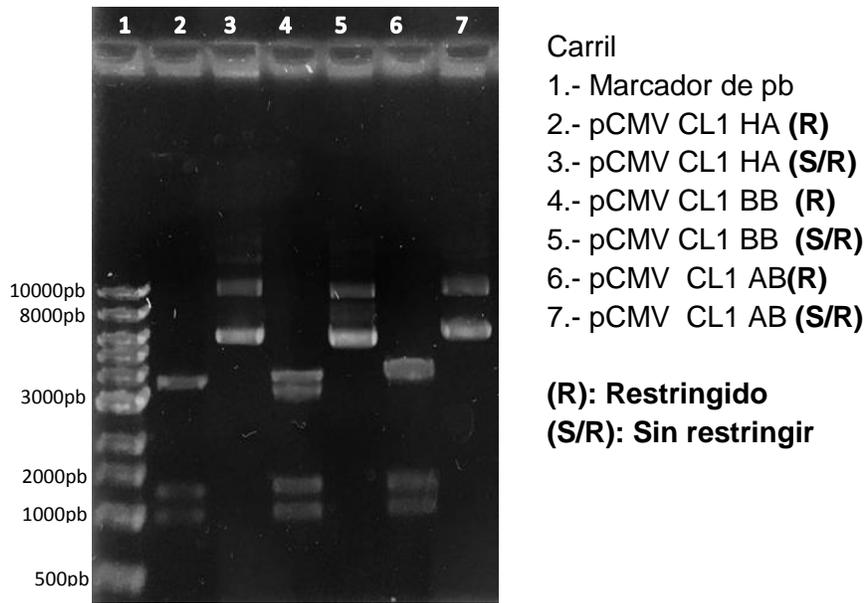


Figura 11. Análisis de restricción de los plásmidos que contienen las 3 isoformas de la latrofilina-1. Carriles 2 y 3, isoforma Lphn-1 Δ A, Δ B (sin la secuencia de ganancia extracelular ni la intracelular); carriles 4 y 5, isoforma Lphn-1 (con las secuencias de ganancia extracelular e intracelular); carriles 6 y 7, isoforma Lphn-1 Δ A que sólo contiene la secuencia de ganancia intracelular.

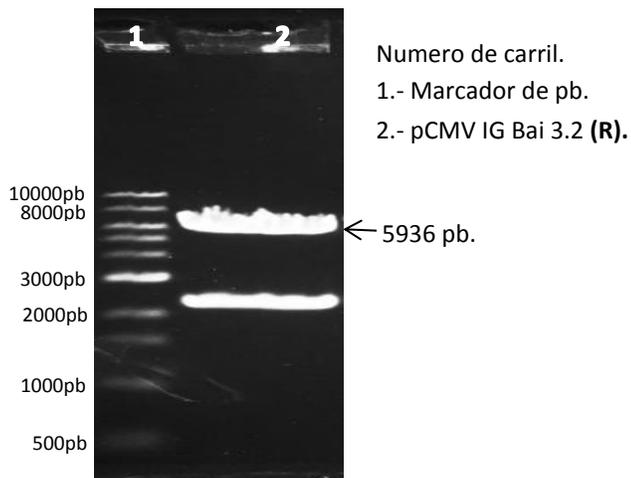


Figura 12. Restricción del plásmido vector. La banda de 5936 pb se purificó para insertar los amplicones que corresponden a la región extracelular de los ligandos solubles (teneurína-2, neurexina 1 β y FLRT3).

6.1.2 PCR de punto final. Mediante el programa bioinformático *Serial cloner* se diseñaron oligonucleótidos para amplificar la región extracelular de la teneurina-2, la neurexina 1 β y FLRT3, así como para insertar secuencias de reconocimiento por las enzimas de restricción y epitopos para facilitar sus purificación como se describió anteriormente. Los fragmentos obtenidos fueron de 7236 pb para teneurina-2, de 788 pb para neurexina 1 β y de 1649 pb para FLRT3 (Figura 13).

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para amplificar por PCR la región extracelular de teneurina-2, neurexina 1 β y FLRT3

Secuencia	Temp. Alin. °C	% GC	Proteína	Propósito	Sentido
gatACGCGTATGGCCCCCTTG	71	67	TEN2	Sitio de corte MluI	For
ACGCgtcgacgccctggaataaagggtctcTCCCATCTCATTC	68	50	TEN2	Sitio de corte TEV y Sall	Rev
gatACGCGTatgtctgcacttc	59	52	NRX1B	Sitio de corte MluI	For
acgcGTCGACGCCCTGGAAATAAAGGTTCTCctcagttgtcatag	67	46	NRX1B	Sitio de corte TEV y Sall	Rev
gatACGCGTATGGAGACAGAC	55	52	FLRT3	Sitio de corte MluI	For
acgcGTCGACGCCCTGGAAATAAAGGTTCTCcaaaggtaaattgg	46	57	FLRT3	Sitio de corte TEV y Sall	Rev

For, sentido (*forward*); Rev, antisentido (*reverse*); Temp. Alin, temperatura de alineamiento.

6.1.3 Ensayos de ligación. Con los productos de las reacciones de ligación de los insertos y el vector se transformaron bacterias DH5- α para la extracción y purificación del ADN de las nuevas construcciones plasmídicas correspondientes a los ligandos sintéticos. Para verificar que el ADN obtenido correspondía a estas construcciones, se realizaron restricciones con las enzimas SalI y EcoRI observándose un patrón de bandas que correspondió al esperado. La Figura 14 muestra el patrón de restricción y la Figura 15 los mapas de los plásmidos obtenidos.

El patrón de restricción predicho para las nuevas construcciones fue el siguiente:

- a) pCMV-Ig-neurexina1 β -TEV: 2 bandas de 5918 y 792 pb.
- b) pCMV-Ig-FLRT3-HA-TEV: 3 bandas de 5918, 907 y 746 pb.
- c) pCMV-Ig-Ten2-Flag-TEV: 5 bandas de 5918, 3439, 2882, 657 y 270 pb.

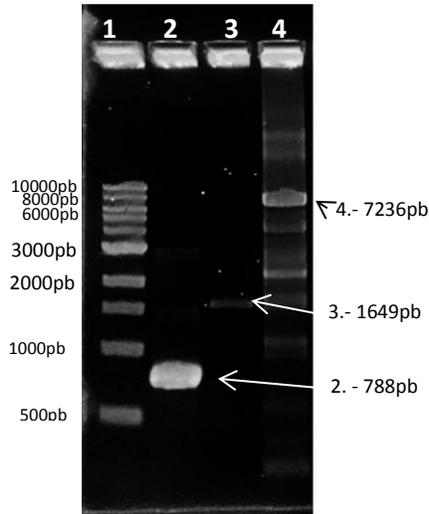


Figura 13. Productos de PCR de punto final. Carril 1, marcador de tamaño molecular; carril 2, fragmento específico de 788 pb correspondiente a la región extracelular de la neurexina 1 β ; carril 3, se observan 2 bandas de las cuales la de 1649 pb corresponde a la región extracelular de FLRT3 y la segunda es inespecífica; carril 4, se observan varias bandas inespecíficas y la de 7236 pb corresponde a la región extracelular de teneurina-2.

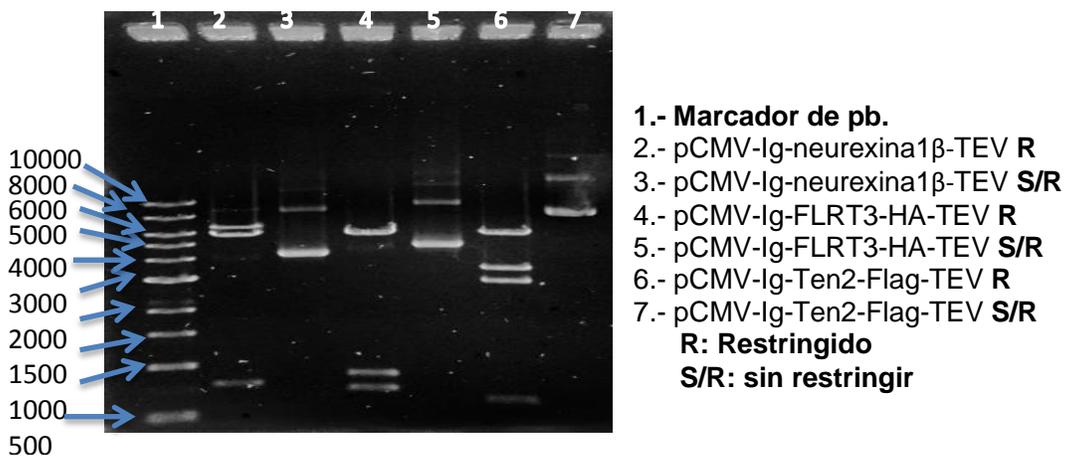


Figura 14. Análisis de restricción de las nuevas construcciones plasmídicas. Carriles 2 y 3, pCMV-Ig-neurexina1 β -TEV; carriles 4 y 5, pCMV-Ig-FLRT3-HA-TEV; carriles 6 y 7, pCMV-Ig-Ten2-Flag-TEV.

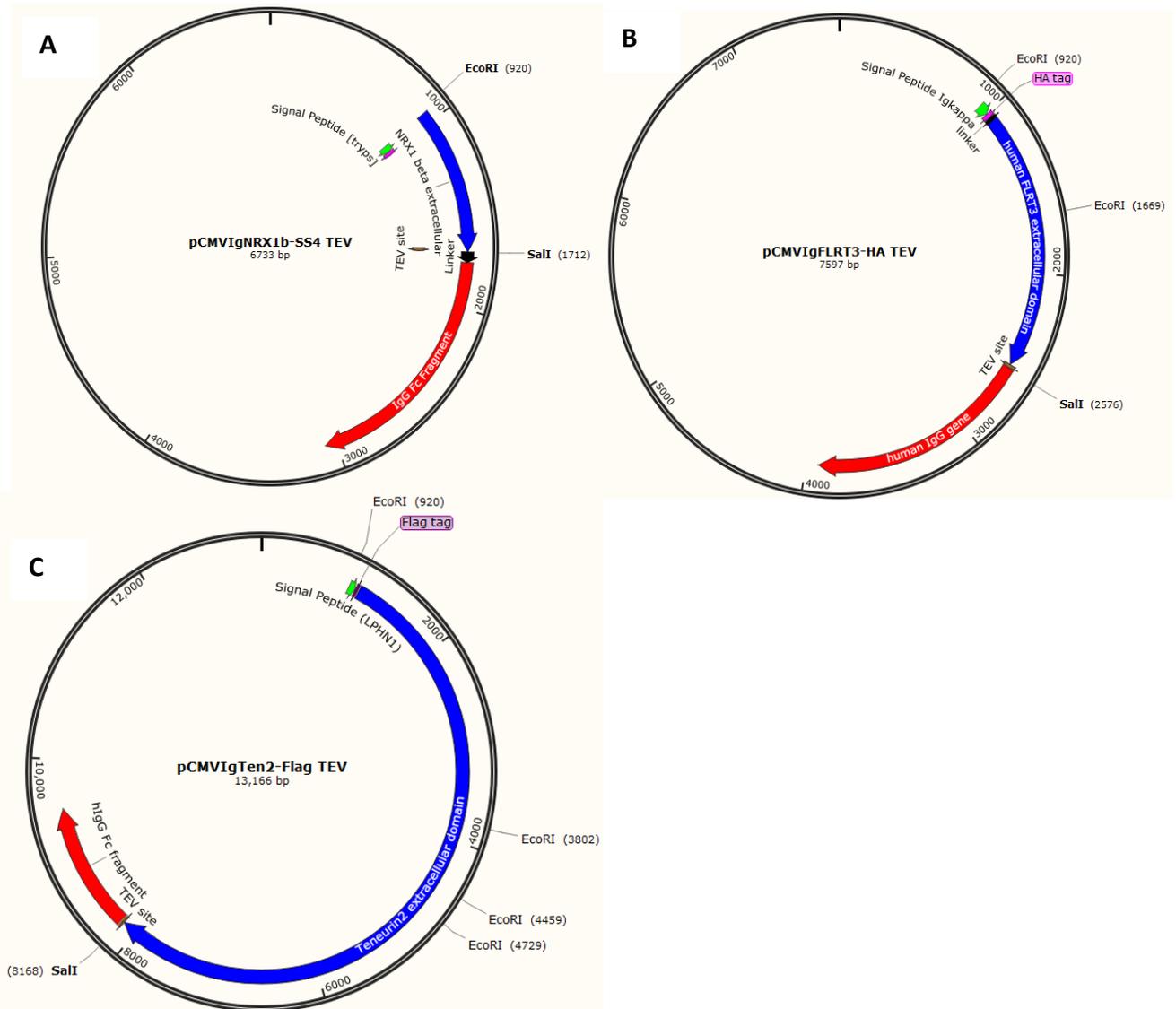


Figura 15. Mapas de las construcciones plasmídicas de los ligandos solubles sintéticos. A, Ig-neurexina-TEV; B, Ig-FLRT3-TEV; C, Ig-teneurina-2-TEV. En cada uno de los mapas se muestran los sitios de corte de EcoR1 y Sal1, enzimas con las cuales fueron restringidos.

6.1.4 Secuenciación de las nuevas construcciones plasmídicas

Los plásmidos obtenidos se secuenciaron en su parte inicial, que codifica la proteína, a fin de verificar la identidad de la secuencia de nucleótidos. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

neurexina-1 β : gatACGCGTatgtctgcacttc
teneurina 2: gatACGCGTATGGCCCGCTTG
FLRT-3: gatACGCGTATGGAGACAGAC

La secuenciación indicó que las secuencias de nucleótidos correspondían a las esperadas (Figuras 16, 17 y 18).

```
AACTTGCTTAACTGCAGTTGCTGACTACAAAGACGATGACGACAAGCTTGCGGCCGCGGCATCC
AGTTTGGGAGCGCACCACATCCACCATTTCCATGGCAGCAGCAAGCATCATTAGTGCCTATTGC
AATCTACAGGTCACCAGCATCCTTGCGAGGGCGGACACGCTGGGACGACGTATATCTTTAGCAA
GGTGGTGGACAAATTACATATAAGTGGCCTCCTAATGACCGACCCAGTACACGAGCAGACAGGC
TGGCCATCGGGTTTAGCACTGTTTCCAGAAAGGAAGCAGTGTGGTGGCGTGTGGACAGTTCCTCGGG
CCTGGGTGACTACCTTGAGCTGCACATACACCAAGGAAAAATTGGAGTTAAATTTAATGTTGGGA
CAGATGACATCGCCATTGAGGAGTCCAATGCAATCATTAAATGATGGAAAATACCATGTAGTGCGT
TTCACGAGGAGTGGTGGCAATGCCACGTTACAGGTGGACAGCTGGCCAGTCATCGAACGATACC
CTGCAGGGCGTCAGCTCACAATCTTCAATAGCCAAGCAACCATAATAATTGGCGGGAAAGAGCA
GGGCCAGCCCTTCCAGGGCCAGCTCTCTGGGCTTTACTACAATGGCTTGAAAGTTCTGAATATG
GCGGCAGAGAACGATGCCAACATCGCCATAGTGGGAAATGTGAGGCTGGTCCGGTGAAGTGCCTT
CCTCTATGACAACTGAGGAGAACCTTTATTTCCAGGGCGTCGACGAGAATCTTTATTTTCAGGGC
CTCGACTCTAGGATCGATCCCAGTCCCAGGGGTGAGTACTAAGCTTCAGCGCTCCTGCCTGGAC
GCATCCCGGCTATGCAGCCCCAGTCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCGTCTGCCTCTCACCCG
GAGGCCTCTGCCCGCCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTTTCCCCAGGCTCTG
GGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCTAACCAGGCCCTGCACACAAAGGGGCAGTGTCTGGGCTCA
GACCTGCCCAAGAGCCATATCCGGAGGACCCTGCCCTGACCCTAAAGCCACCCCAAAGGC
CAACTCTCACCTCGTCAGCTCGGACACTTCTCCTTCCAGATCAAGGTAACTCGATCATCTGTCT
GCAGAAGCCCTCTACCTA
```

Figura 16. Secuencia de nucleótidos correspondientes a neurexina 1 β (*Mus Musculus*) contenida en el plásmido pCMV-Ig-neurexina1 β -TEV. La primera sección (negro) corresponde al péptido señal; la sección en rojo corresponde al epitopo FLAG; la sección en café corresponde a la secuencia de la proteína; la sección en amarillo corresponde al sitio consenso para la enzima TEV; la sección en negro incluye los sitios de corte por las enzimas de restricción; la sección en azul corresponde a la Fc-IgG. La secuencia corresponde a la parte extracelular de neurexina1 β (475 aa).

GTATGGGAATGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGT**GACTATCCATATGATGTTCCAGATTA**
TGCTGGGGCCCAGCCGGCCAGATCTTGCCATCTGTGTGTCGCTGCGATGCGGGTTTCATTT
 ACTGTAATGATCGCTTTCTGACATCCATTCCAACAGGAATACCAGAGGATGCTACAACCTCTCT
 ACCTTCAGAACAACCAATAAATAATGCTGGGATTCCTTCAGATTTGAAAACTTGCTGAAAGT
 AGAAAGAATATACCTATACCACAACAGTTTAGATGAATTTCTACCAACCTCCCAAAGTATGTA
 AAAGAGTTACATTTGCAAGAAAATAACATAAAGGACTATCACTTATGATTCATTTCAAAAATTCC
 CTATCTGGAAGAATTACATTTAGATGACAACCTCTGTCTCTGCAGTTAGCATAGAAGAGGGGAGC
 ATTCCGAGACAGCAACTATCTCCGACTGCTTTTCCTGTCCCGTAATCACCTTAGCACAATTCC
 CTGGGGTTTGCCAGGACTATAGAAGAACTACGCTTGGATGATAATCGCATATCCACTATTTCC
 ATCACCATTCTTTCAAGGTCTCACTAGTCTAAAACGCCTGGTTCTAGATGGAACCTGTTGAA
 CAATCATGGTTTAGGTGACAAAGTTTTCTTCAACCTAGTTAATTTGACAGAGCTGTCCCTGGTG
 CGGAATTCCTGACTGCTGCACCAGTAAACCTTCCAGGCACAAACCTGAGGAAGCTTTATCTT
 CAAGATAACCACATCAATCGGGTGCCCCAAATGCTTTTTCTTATCTAAGGCAGCTCTATCGA
 CTGGATATGTCCAATAATAACCTAAGTAATTTACCTCAGGGTATCTTTGATGATTTGGACAATA
 TAACACAACCTGATTCTTCGCAACAATCCCTGGTATTGCGGGTGCAAGATGAAATGGGTACGTG
 ACTGGTTACAATCACTACCTGTGAAGGGTCAACGTGCGTGGGCTCATGTGCCAAGCCCCAGA
 AAAGGTTTCGTGGATGGCTATTAAGGATCTCAATGCAGACTGTTTGATTGTAAGACAGTTGGAT
 GTAGCACCATTGAGATACCACTGCCATTACCCACACAGTGTAAATCCCTGCCTAGGACCAGGT
 GGCCAGCCTTCCAGGTTGTAGC

Figura 17. Secuencia de nucleótidos correspondientes a FLRT-3 (*Homo Sapiens*) contenida en el plásmido pCMV-Ig-FLRT3-HA-TEV. La sección en negro corresponde al péptido señal; en rojo corresponde al epitopo HA; la sección en café incluye los sitios de reconocimiento por las enzimas de restricción; la sección en azul corresponde a la región extracelular de FLRT-3. La secuencia corresponde a la parte de extracelular de FLRT3 (750aa).

ATGGTGGATTCTGTGTGACGACTGTCCTCGTTACCTCTGCTACCCAA**GATTACAAGGATGACG**
ACGATAAAGGAGGCCAGGATCCCGCGTATTTTCATAGCAATGCATCTGCTCGGACTCAATTGG
 CAACTCCAGCCTGCAGATGGGCACACCTTTAACAATGGGATAAGGACCGGCTTACCAGGAAA
 CGATGATGTGGCAACAATGCCATCTGGAGGCAAAGTGCCCTGGTTCGTTGAAAAACAGCAGCA
 TAGACAGTGGTGAAGCAGAAGTTGGTCGGCGGGTAACACAAGAAGTCCCACCAGGGGTGTTT
 TGGAGGTCACAAATTCACATCAGTCAGCCCCAGTTCTTAAAGTTCAACATCTCCCTCGGGAAG
 GACGCTCTCTTTGGTGTTFACATAAGAAGAGGACTTCCACCATCTCATGCCAGTATGACTTC
 ATGGAACGTCTGGACGGGAAGGAGAAGTGGAGTGTGGTTGAGTCTCCAGGGAACGCCGGA
 GCATACAGACCTTGTTTCAAGATGAAGCCGTGTTTGTGCAGTACCTGGATGTGGGCCTGTGG
 CATCTGGCCTTCTACAATGATGGAAAAGACAAAGAGATGGTTTCTTCAATACTGTTGTCTTA
 GATTCAGTGCAGGACTGTCCACGTAACCTGCCATGGGAATGGTGAATGTGTGTCCGGGGTGTG
 TCACTGTTTCCCAGGATTTCTAGGAGCAGACTGTGCTAAAGCTGCCTGCCCTGTCTGTGCA
 GTGGGAATGGACAATATTCTAAAGGGACGTGCCAGTGCTACAGCGGCTGGAAAGGTGCAGA
 GTGCGACGTGCCCATGAATCAGTGCATCGATCCTTCTGCGGGGGCCACGGCTCCTGCATT
 GATGGGAACCTGTGTCTGCTCTGCTGGCTACAAAGGCGAGCACTGTGAGGAAGTTGATTGCTT
 AGATCCCACCTGCTCCAGCCACGGAGTCTGTGTGAATGGAGAATGCCTGTGCAGCCCTGGCT
 GGGGTGGTCTGAACTGTGAGCTGGCGAGGGTCCAGTGCCAGACCAGTGCAGTGGCATGGC
 AACGTACCTGCCCTGACACGGGCCTCTGCAGCTGCGATCCCAAACCTGAAATGGATTCCGACT
 GGCTCTGTTGGAAGGTGGTGTCTAGTAGAACCTTTGTGTGGCCAACCTTCCAACG

Figura 18. Secuencia de nucleótidos correspondientes a Teneurina-2 (*Synthetic construct Loss-B gene complete CDS*) contenida en el plásmido pCMV-Ig-Ten2-Flag-TEV. La sección en negro corresponde al péptido señal; en rojo al epitopo FLAG; la sección en café incluye los sitios de reconocimiento por las enzimas de restricción; la sección en azul corresponde a la región extracelular de teneurina-2. La secuencia corresponde a la parte extracelular de teneurina-2 (2613 aa).

6.2 Expresión de los ligandos solubles sintéticos del receptor latrofilina-1

Para la obtención de los ligandos sintéticos se realizaron pruebas preliminares transfectando células HEK-293 y células HEK-293T con las nuevas construcciones plasmídicas que contienen a los ligandos solubles endógenos de la latrofilina-1. Las células fueron transfectadas por el método de precipitación de fosfato de calcio y la colección del medio de cultivo se realizó 4 días después de la transfección.

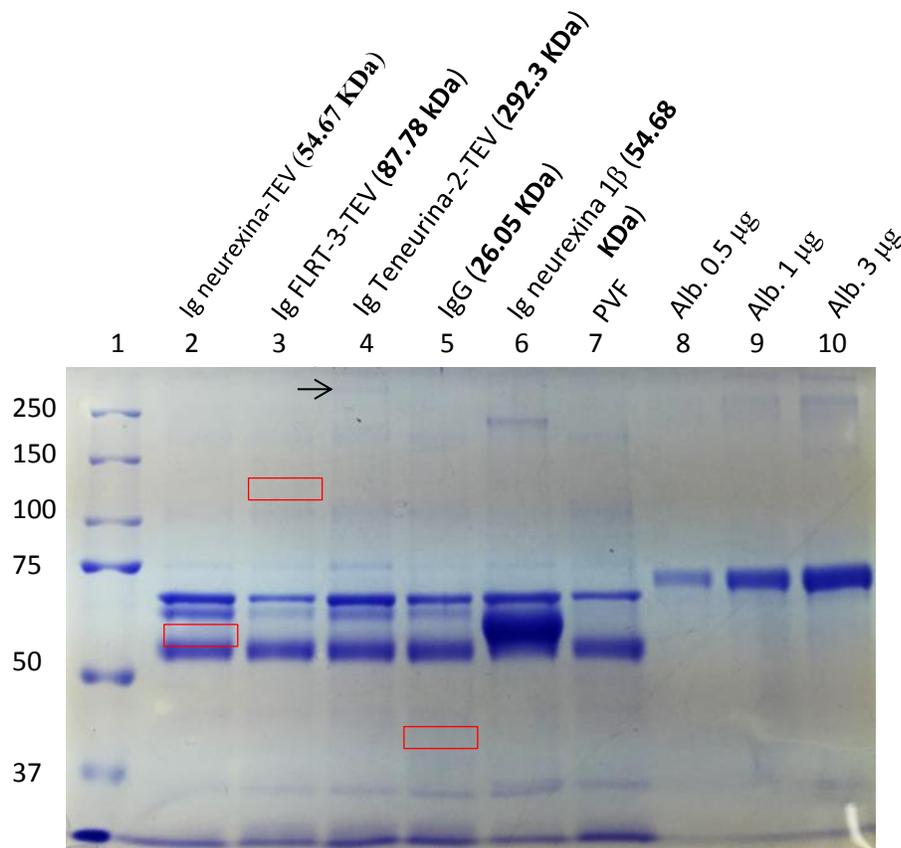


Figura 19. Expresión de los ligandos sintéticos por células HEK-293 transfectadas. Análisis de las proteínas prepurificadas. Carriles 2-4, ligandos solubles; carril 5, control de transfección (Fc IgG); carril 6, control de transfección (Ig-neurexina 1 β , 54.68 KDa); carril 7, control negativo de transfección (proteína verde fluorescente, PVF); carriles 8-10, albúmina sérica bovina (Alb.). Las flechas indican las bandas que corresponden a las proteínas transfectadas y expresadas, los cuadros rojos indican los sitios en el que se esperarían las proteínas que no fueron expresadas. Gel teñido con azul de Comassie.

Las células HEK-293 expresaron la Ig-teneurina-TEV y al control de transfección (Ig-neurexina 1 β , 58.68KDa), pero no a Ig-neurexina-TEV (54.67 KDa), Ig-FLRT-3-TEV y a un segundo control de transfección (FcIgG). Las bandas adicionales corresponden a proteínas presentes en el medio de cultivo (Figura 19). En las células HEK-293T se detectó la expresión de Ig-neurexina-TEV (54.67 KDa), Ig-FLRT-3-TEV, Ig-teneurina-TEV y ambos controles de transfección (Fc IgG e Ig-neurexina 1 β , 58.68 KDa), aparentemente en mayor cantidad con base en los niveles detectados de albúmina (Figura 20).

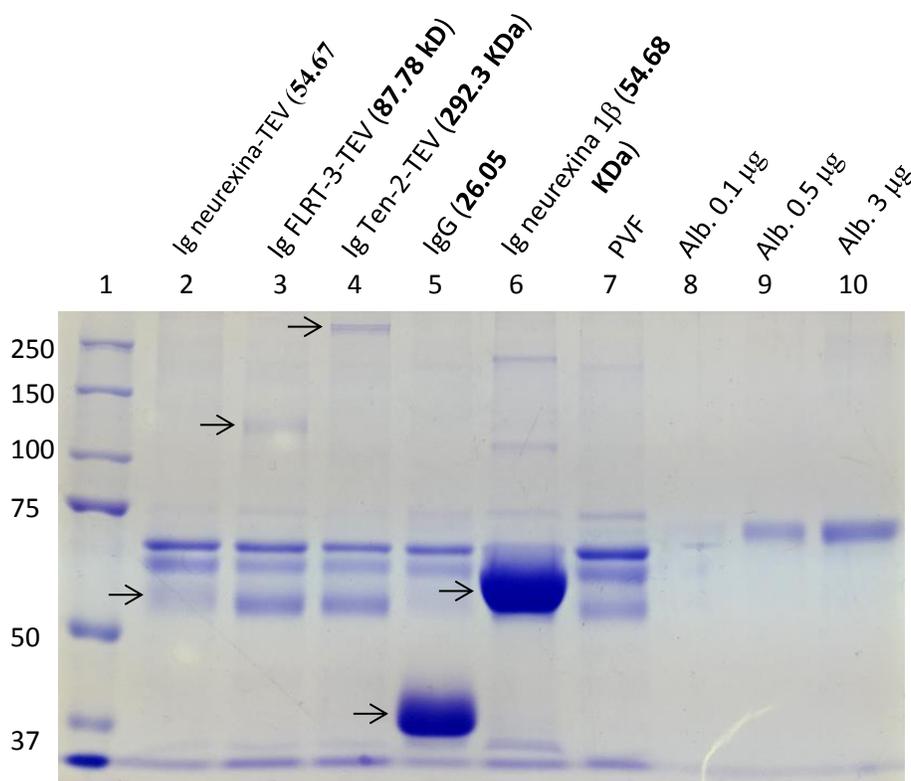


Figura 20. Expresión de los ligandos por células HEK-293T transfectadas. Análisis de las proteínas purificadas. Carriles 2-4, corresponden a los ligandos solubles; carril 5, control de transfección (Fc IgG); carril 6, control de transfección (Ig-neurexina 1 β , 54.68 KDa); carril 7, control negativo de transfección (proteína verde fluorescente, PVF); carriles 8-10, albúmina sérica bovina (Alb.). Se señala con una flecha las bandas que corresponden a las proteínas que si son expresadas. Gel teñido con azul de Comassie.

Para comprobar que las bandas obtenidas correspondían a los ligandos solubles, se realizaron ensayos de Western Blot, utilizando un anticuerpo anti-IgG policlonal de ratón acoplado a la peroxidasa de rábano. Los resultados mostraron que las bandas observadas en el gel teñido con azul de Comassie corresponden a los ligandos solubles sintéticos (Figura 21).

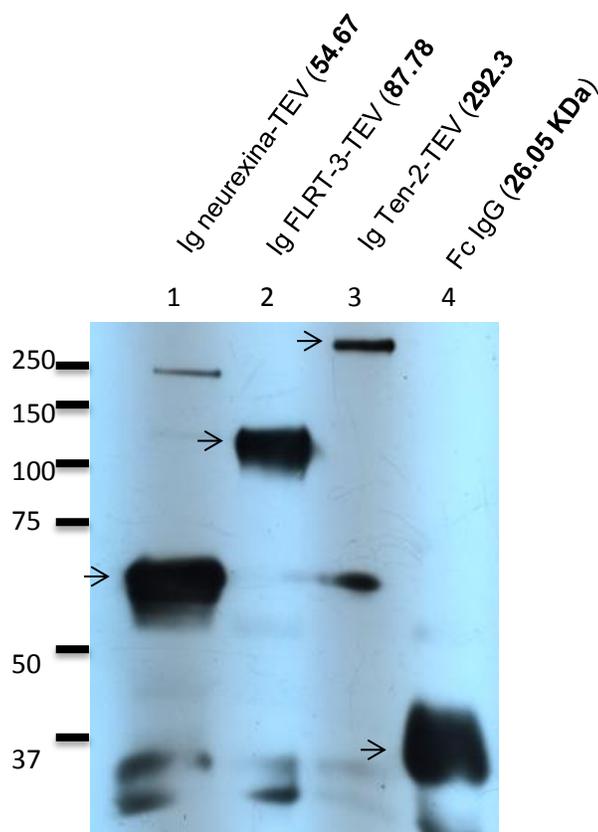


Figura 21. Western blot que muestra la expresión de los ligandos solubles sintéticos por las células HEK-293T. Carril 1, Ig-neurexina-TEV; carril 2, Ig-FLRT-3-TEV; carril 3, Ig-teneurina-TEV; carril 4, FcIgG (control de transfección). Las flechas señalan las bandas que corresponden a los ligandos sintéticos.

Una vez confirmada la expresión de los ligandos por las células HEK-293T transfectadas, se optó por la producción de la Ig-neurexina-1 β (54.68 kDa) ya que se expresó en mayor cantidad con respecto a las demás, así como de Ig-FLRT3-TEV ya que el receptor latrofilina-1 tiene una alta afinidad por este

ligando (Kd 0.64 nM). Cuatro días después de la transfección de las células se realizó la extracción y la purificación de los ligandos solubles, obteniéndose 50 μ l de Ig-neurexina 1 β (54.68 KDa) con una concentración de \sim 5 μ g/ μ l; el rendimiento de Ig FLRT3-TEV fue escaso (\sim 0.1 μ g/ μ l) aunque suficiente para los ensayos funcionales posteriores (Figura 22).

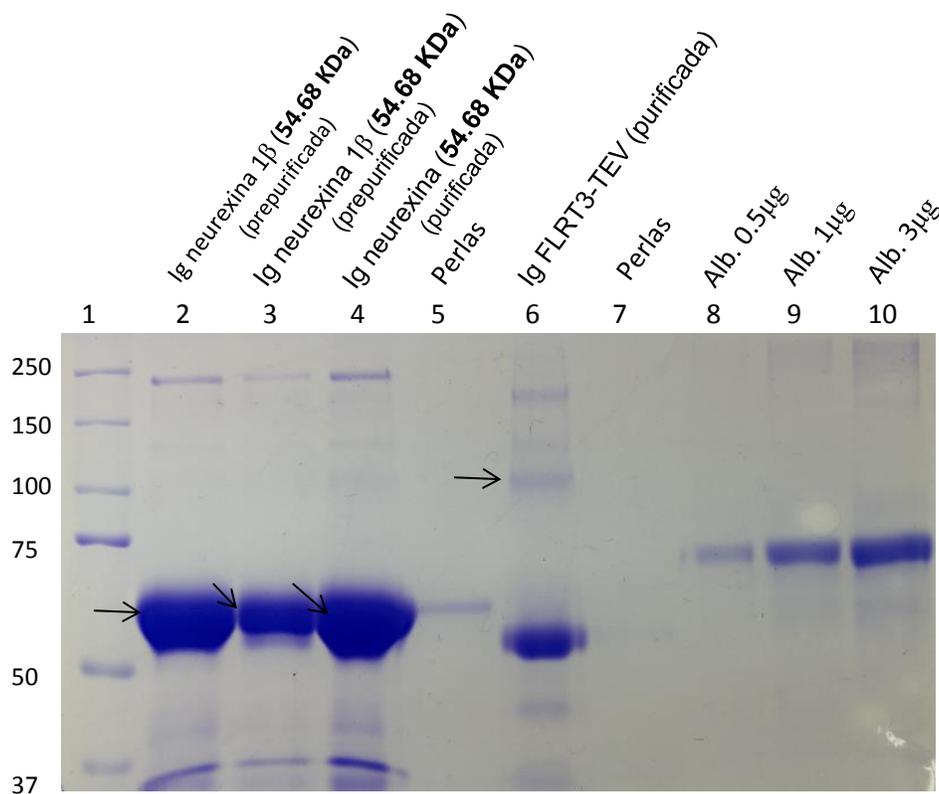


Figura 22. Ligandos sintéticos purificados. Carril 2, Ig-neurexina (54.68 KDa) prepurificada; carril 3, Ig neurexina (54.68 KDa) prepurificada; carril 4, Ig-neurexina 1 β (54.68 kDa) purificada; carril 5, perlas de sefarosa utilizadas para purificación de la Ig neurexina 1 β ; carril 6, Ig-FLRT3-TEV purificada; carril 7, perlas de sefarosa con las que fue purificada la Ig FLRT3-TEV; Carriles 8-10, concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina. Las flechas indican las bandas que corresponden a los ligandos. Gel teñido con azul de Coomassie.

6.3 Optimización de la expresión heteróloga del receptor latrofilina-1

Se evaluaron en paralelo 2 métodos de transfección transitoria para la expresión heteróloga de las dos isoformas del receptor latrofilina-1 (Lphn-1 Δ A, Δ B y Lphn-1 Δ A). Los métodos de Polietilenimina (PEI) y de Lipofectamina 2000 fueron evaluados a 24 y 48 h post-transfección.

Las células HEK-293T (confluencia 80-90%) se transfectaron con el plásmido pCMV-eGFP que codifica una proteína verde fluorescente, y se evaluó la eficacia de transfección mediante citometría de flujo determinando la fluorescencia emitida por la proteína fluorescente (Figura 23). Los resultados se comparan en la Tabla 3.

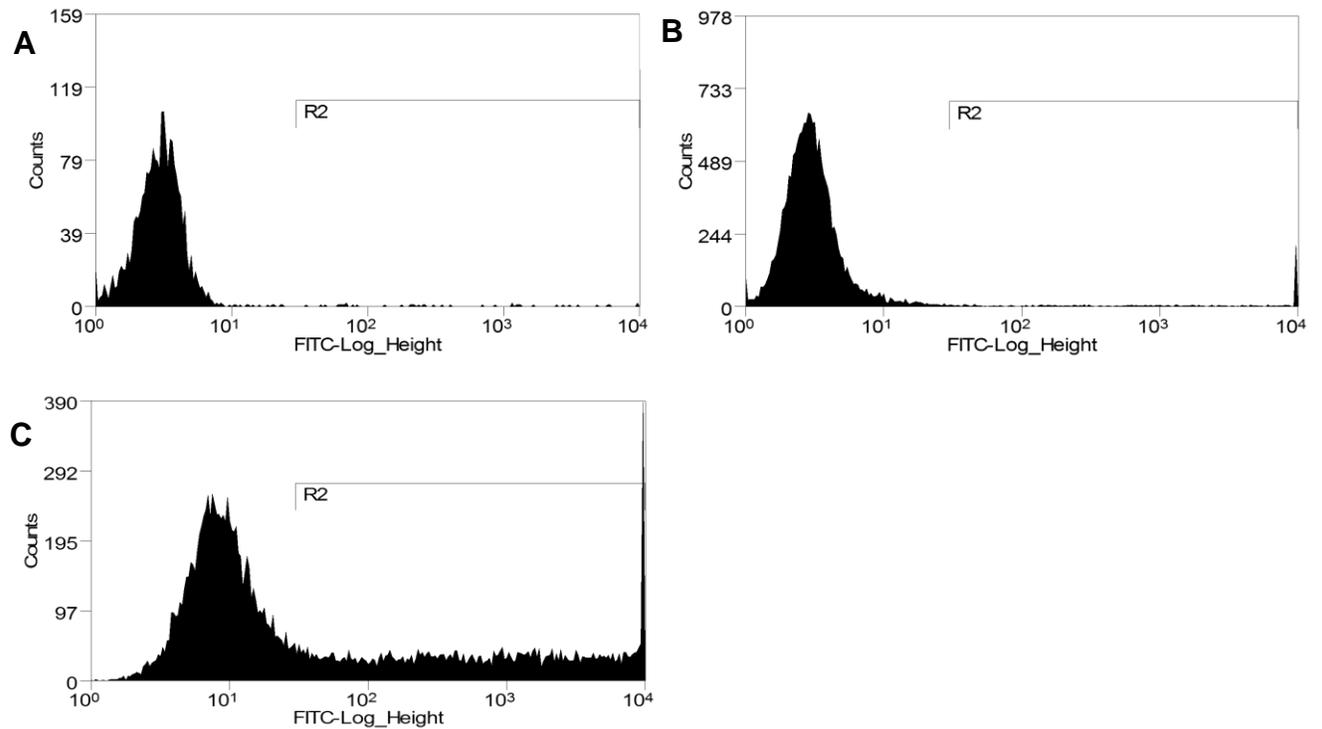


Figura 23. Análisis por citometría de flujo de la expresión de la proteína verde fluorescente por células HEK-293T transfectadas. El análisis se realizó 24 h post-transfección. En el eje X se muestra la fluorescencia emitida por la proteína y en el eje Y el número de células; R2 indica la población de células positivas. A, control negativo; B, transfección con PEI; C, transfección con Lipofectamina 2000. Histogramas representativos de 3 experimentos realizados.

Tabla 3. Comparación de la eficacia de transfección

Tiempo	Método de transfección	
	PEI	Lipofectamina 2000
24 h	8.4 ± 1.8%	45.6 ± 0.3%
48 h	25.6 ± 2.5%	51.1 ± 3.7%

Los valores corresponden al porcentaje de células positivas para la proteína verde fluorescente y representan el promedio ± el error estándar de 3 experimentos.

La transfección con Lipofectamina 2000 mostró mayor eficacia que el método basado en PEI, si bien la eficacia del segundo método aumentó a las 48 h. Aunque la lipofectamina fue más eficaz, se decidió optimizar el método basado en PEI, con base en la relación costo/beneficio. La Tabla 4 muestra los cambios en el método, esencialmente en la preparación de la solución de PEI.

Tabla 4. Cambios en la preparación de la solución de PEI

	Preparación anterior	Nueva preparación
Concentración	1 mg/ml	1 mg/ml
Disolvente	H ₂ O	PBS pH 4.5
Disolución	Pulsos de 10 s con microondas y agitación suave	Baño maría (70-80°C) y agitación vigorosa con vórtex
Almacenamiento	4°C	-20°C
	Protección de la luz	Protegido de la luz
Relación ADN : PEI	1 : 10	1 : 5

Con la nueva preparación se transfectaron células HEK-293T evaluando 4 cantidades de ADN (1.4, 3.5 y 7 µg en cada pozo) de los plásmido pCMV-eGFP y pCMV-CL1-mV que codifica al receptor latrofilina-1 fusionado con la proteína Venus monomérica. Esta latrofilina es semejante a las que se estudian en este proyecto (isoformas Lphn-1ΔA, ΔB y Lphn-1ΔA).

La eficacia fue determinada por citometría de flujo 48 h después de la transfección (Figuras 24 y 25) y los resultados se comparan en las Tablas 5 y 6.

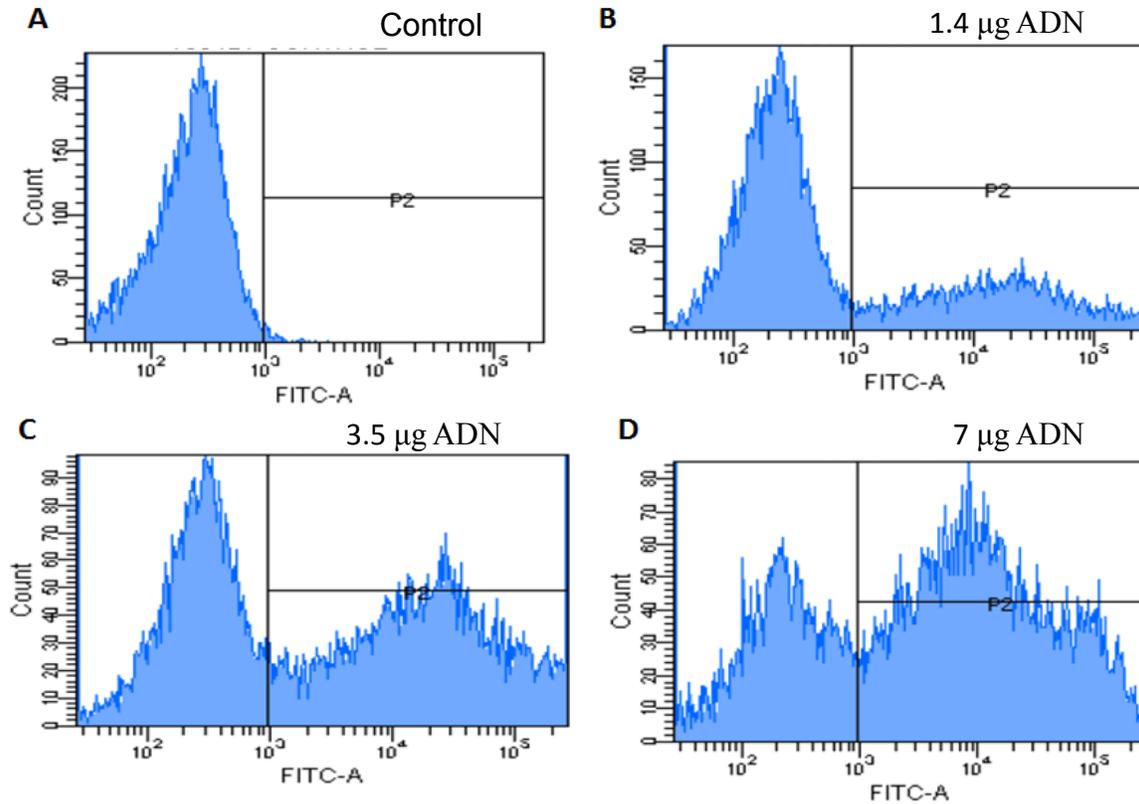


Figura 24. Análisis por citometría de flujo de la expresión de la proteína verde fluorescente por células HEK-293T transfectadas con el plásmido pCMV-GFP y el método de PEI. P2 indica la población de células positivas a la proteína verde fluorescente. A, control negativo; B, 1.4 µg de ADN; C, 3.5 µg de ADN; D, 7 µg de ADN. Histogramas representativos de 3 experimentos realizados.

Tabla 5. Eficacia de transfección con diferentes cantidades de ADN plasmídico (pCMV-GFP).

ADN (µg)	Eficacia de transfección
1.4	70.2 ± 7.1
3.5	75.0 ± 1.2
7	70.0 ± 3.2

Los valores corresponden al porcentaje de células positivas para la proteína verde fluorescente y representan el promedio ± el error estándar de 3 experimentos.

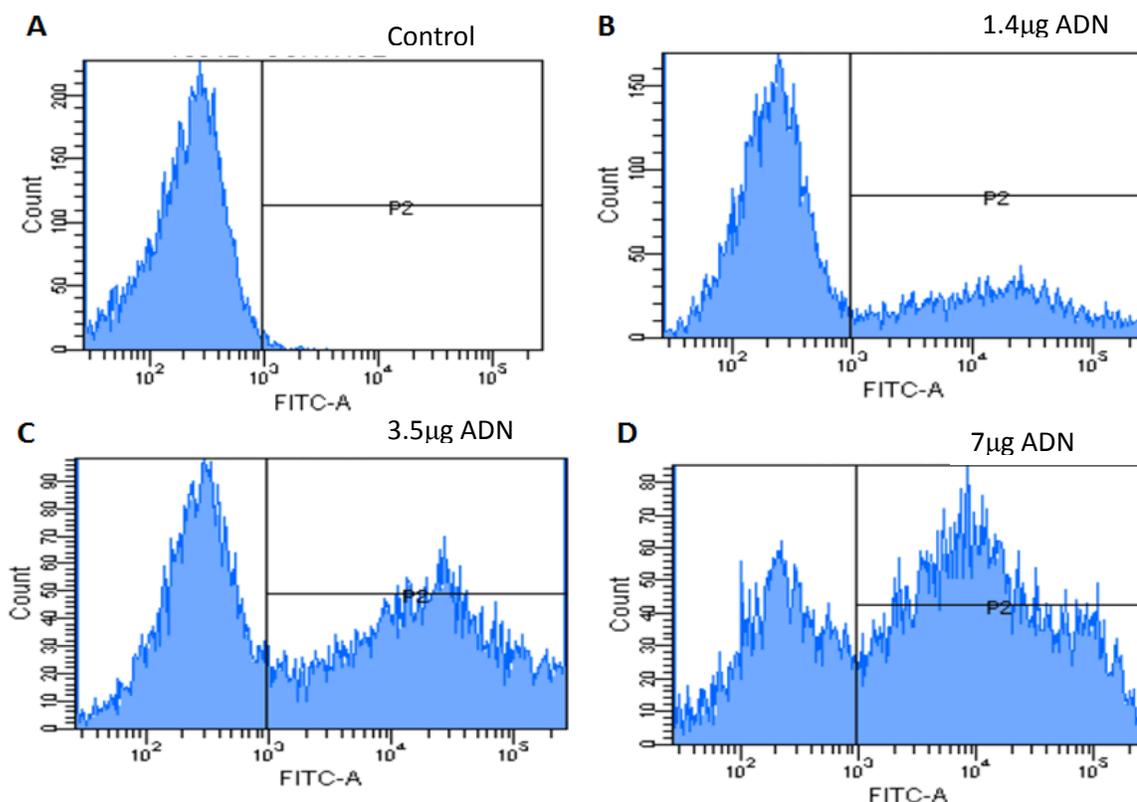


Figura 25. Análisis por citometría de flujo de la expresión de la latrofilina-1 fusionada con la proteína Venus fluorescente por células HEK-293T transfectadas con el plásmido pCMV-CL1-mV y el método de PEI. P2 indica la población de células positivas a la proteína verde fluorescente. A, control negativo; B, 1.4 µg de ADN; C, 3.5 µg de ADN; D, 7 µg de ADN. Histogramas representativos de 3 experimentos realizados.

Tabla 6. Eficacia de transfección con diferentes cantidades de ADN plasmídico (pCMV-CL1-mV).

ADN (µg)	Eficacia de transfección
1.4	25.7 ± 3.8
3.5	50.7 ± 7.0
7	56.1 ± 4.7

Los valores corresponden al porcentaje de células positivas para latrofilina-1 con la proteína Venus fusionada y representan el promedio ± el error estándar de 3 experimentos.

6.4 Comprobación de la expresión del receptor latrofilina-1 (isoformas Lphn-1 Δ A, Δ B y Lphn-1 Δ A) por ensayo de Western Blot

Una vez optimizado el método de transfección, las células HEK-293T fueron transfectadas con el plásmido pCMV-CL1 HA que contiene a la isoforma Lphn-1 Δ A, Δ B del receptor latrofilina-1, el plásmido pCMV-CL1AB que contiene la isoforma Lphn-1 Δ A y el plásmido pCMV-CL1 BB que contiene la isoforma Lphn-1 de este receptor. Las primeras 2 isoformas tienen la bandera de hemaglutinina (HA) en la primera asa extracelular.

Utilizando un anticuerpo monoclonal primario anti-HA de conejo se detectaron para la isoforma Lphn-1 Δ A, Δ B bandas de ~160 kDa y ~70 kDa (Figura 26); para la isoforma Lphn-1BB (control negativo) no se observó ninguna banda ya que no contiene la bandera HA; en el caso de la isoforma Lphn-1 Δ A, se observan dos bandas, de ~163 y ~74 kDa. Para el control negativo, células sin transfectar, no se observaron bandas y para el control positivo (glicoproteína asociada a la mielina, MAG, soluble marcada con la bandera HA) se observó una banda mayor a 82.26 kDa, que es el peso molecular teórico.

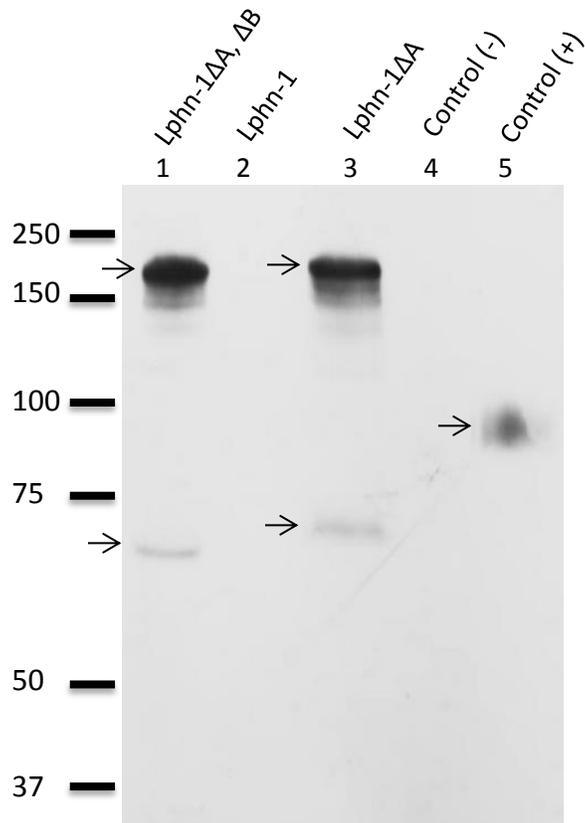


Figura 26. Expresión del receptor Latrofilina-1 (isoformas Lphn-1ΔA, ΔB y Lphn-1ΔA) por células HEK-293T transfectadas. Carril 1, isoforma Lphn-1ΔA, ΔB marcada con la bandera HA; carril 2, isoforma Lphn-1 sin la bandera HA; carril 3, isoforma Lphn-1ΔA marcada con la bandera HA; carril 4, control negativo (células sin transfectar); carril 5, control positivo (MAG soluble que contiene la bandera HA). Se señalan con flechas las bandas que corresponden a las proteínas expresadas.

7. Discusión

Mediante el diseño de las estrategias moleculares y el programa bioinformático *Serial Cloner* se diseñaron oligonucleótidos que permitieron generar las construcciones plasmídicas utilizadas para la expresión de los ligandos solubles sintéticos de latrofilina-1. Estos ligandos están fusionados a la Fc de la IgG humana, a fin de purificar estas proteínas de una forma sencilla y rápida, así como permitir su inmunodetección. El sitio consenso para la enzima TEV fue insertado para separar la región que corresponde a la parte extracelular (soluble) de cada ligando en caso que la Fc IgG interfiriera en los ensayos funcionales de interacción ligando-receptor. La inserción de la bandera HA permite también la inmunodetección de las proteínas de interés.

La identidad de las construcciones fue confirmada en primero instancia por ensayos de restricción, que indicaron un patrón concordante con el predicho para pCMV-Ig-neurexina1 β -TEV, pCMV-Ig-FLRT3-HA-TEV y pCMV-Ig-Ten2-Flag-TEV. La secuenciación de las nuevas construcciones plasmídicas confirmó que codificaban los ligandos solubles del receptor latrofilina-1.

La transfección de estas construcciones plasmídicas en células HEK-293 y HEK-293T indicó que estas últimas expresaron a los 3 ligandos (Ig-neurexina 1 β -TEV, Ig-FLRT-3-TEV y Ig-teneurina-2-TEV) mientras que las células HEK-293 expresaron sólo a la Ig-teneurina-2-TEV, si bien en menor cantidad. Esta diferencia puede deberse a que las células HEK-293T contienen el gen del antígeno T de SV40 (*Simian Vacuolating Virus 40 TAg*) (56), que tiene la capacidad de unirse a proteínas supresoras tumorales, como p53 y p150, e inhibirlas, lo que evita el paso a la fase G1 del ciclo celular e induce el paso directo a la fase S, en la que se lleva a cabo la replicación del ADN. Lo anterior conduce a un mayor número de ciclos celulares promoviendo la amplificación del plásmido y con ello una mayor síntesis de la proteína o proteínas de interés. Las bandas obtenidas en los ensayos de Western blot con un anticuerpo anti-IgG coinciden con las observadas en la electroforesis.

Sin embargo, se observaron diferencias con respecto al tamaño teórico que podrían ser explicadas por cambios post-traduccionales de la proteína como la glicosilación, que originan un mayor peso molecular. Por otra parte, el que estas proteínas sean glicosiladas y secretadas por las células HEK-293T implica que adquieren la conformación adecuada y que su estructura terciaria está preservada.

Una vez confirmada la expresión de los ligandos se optó por la producción de Ig-neurexina 1 β y de Ig-FLRT3-TEV debido a la expresión de la primera y a la alta afinidad del receptor latrofilina-1 por Ig FLRT3-TEV (Kd 0.65 nM) (1). Una vez que se purificaron las proteínas su cuantificación fue favorable para este proyecto, con niveles de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en volumen de 50 μl para Ig-neurexina 1 β y Ig-FLRT3-TEV, respectivamente.

Para la expresión del receptor latrofilina-1 se evaluaron 2 métodos de transfección (PEI y Lipofectamina 2000), siendo más eficiente el segundo (25.6% y 51.1% de eficacia a las 48 h). Sin embargo, se optimizó el método basado en PEI obteniéndose eficacias de transfección (48 h) de 75% y 56% para la proteína verde fluorescente y el receptor latrofilina-1 fusionado a la proteína Venus, respectivamente. La diferencia en la eficacia de transfección de ambas proteínas puede deberse al menor peso molecular (~40 KDa) de la proteína verde fluorescente en comparación con la latrofilina-1/proteína Venus que tiene un peso de ~188 KDa.

La expresión de las isoformas (Lphn-1 ΔA , ΔB y Lphn-1 ΔA) del receptor latrofilina-1 en células HEK-293T fue confirmada mediante ensayos de Western Blot. La latrofilina-1 es un GPCR de adhesión que posee un dominio GAIN con un sitio de autoproteólisis (GPS), muy cercano al primer dominio transmembranal, que genera 2 fragmentos, el fragmento amino terminal (NTF) y el fragmento carboxilo terminal (CTF), el segundo constituido por los 7 dominios transmembranales y el dominio carboxilo terminal intracelular (24). Por lo anterior, las bandas observadas para la isoforma corta Lphn-1 ΔA , ΔB (que no contiene las secuencias de ganancia extracelular ni intracelular) fueron de ~160 y ~70 kDa, mismas que representarían

al receptor completo y al CTF, respectivamente. El NTF (89.46 kDa) no es detectado ya que la bandera HA se encuentra en la primera asa extracelular del receptor.

En el caso de la isoforma Lphn-1, la más larga del receptor con las secuencias de ganancia extracelular de 5 aa e intracelular de 44 aa, no se observó ninguna banda ya que no contiene la bandera HA. Para la isoforma Lphn-1 Δ A (que contiene sólo la secuencia ganancia intracelular de 44 aa) se observaron dos bandas, una de ~165 kDa que representa la secuencia completa del receptor, y una de ~75 kDa que representa el CTF. Como se mencionó anteriormente, el NTF (89.46 kDa) no se observa por la ausencia de la bandera HA en este fragmento. La diferencia de peso molecular de las bandas que corresponden al CTF de las isoformas Lphn-1 Δ A y Lphn-1 Δ A, Δ B, se debe a que la isoforma Lphn-1 Δ A contiene 44 aa adicionales en el dominio carboxilo terminal.

8. Conclusiones

1. Se confirmó la identidad de los plásmidos en los que se basó la obtención de nuevos constructos para la generación de ligandos solubles, así como del plásmido vector.
2. Se comprobó la identidad de los plásmidos que contienen las isoformas Lphn-1 Δ A y Lphn-1 Δ A, Δ B del receptor latrofilina-1.
3. Se generaron los plásmidos que codifican los ligandos sintéticos teneurina-2, neurexina-1 β y FLRT-3.
4. Se comprobó la expresión de los ligandos sintéticos solubles en células HEK-293T transfectadas.
5. Se confirmó la expresión de las dos isoformas (Lphn-1 Δ A, Δ B y Lphn-1 Δ A) del receptor latrofilina-1 en células HEK-293T transfectadas.

9. Perspectivas

1. Determinar las características farmacológicas de la interacción ligando-receptor mediante ensayos de saturación por la unión de ligando.
2. Una vez determinadas las características farmacológicas de la interacción ligado-receptor, realizar ensayos funcionales que permitan determinar en primera instancia si el receptor latrofilina-1 está acoplado a proteínas G, y de ser así, establecer el tipo de proteína G. Actualmente se han realizado ensayos preliminares de la determinación de la $[Ca^{2+}]_i$ para establecer las condiciones idóneas del sistema a utilizar (ver Anexo).

10. Referencias

1. Boucard AA., Maxeiner S, Sudhof TC. (2014) Latrophilins function as heterophilic cell-adhesion molecules by binding to teneurins: regulation by alternative splicing. *J. Biol. Chem*; 289: 387-402.
2. Missler M, Südhof TC, Biederer T. (2012) Synaptic cell adhesion. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol*; 4:a005694.
3. Seifert R, Wenzel-Seifert K. (2002). Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*; 366: 381-416.
4. Maudsley S, Martin B, Luttrell LM. (2005). The origins of diversity and specificity in G protein coupled receptor signaling. *J Pharmacol Exp Ther*; 314: 485-94.
5. Johnston CA, Siderovski DP. (2007). Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins: current structural insights. *Mol Pharmacol*; 72: 219-30.
6. Bockaert J, Pin JP. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J*; 18: 1723-9.
7. Smith C, Toohey N, Knight JA, Klein MT, Teitler M. (2011). Risperidone-induced inactivation and clozapine-induced reactivation of rat cortical astrocyte 5-hydroxytryptamine 7 receptors: evidence for in situ G protein-coupled receptor homodimer protomer cross-talk. *Mol Pharmacol*; 79: 318-25.
8. Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR, Hamm HE. (2003). Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev*; 24: 765-81.
9. Oldham WM, Hamm HE. (2006). Structural basis of function in heterotrimeric G proteins. *Q Rev Biophys*; 39: 117-66.
10. Kristiansen K. (2004). Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors:

molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther*; 103: 21-80.

11. Neves SR, Ram PT, Iyengar R. (2002). G protein pathways. *Science*; 296: 1636-9.
12. Shi CS, Kehrl JH. (2001). PYK2 links G (q) alpha and G (13) alpha signaling to NF-kappa B activation. *J Biol Chem*; 276: 31845-50.
13. Schmitt JM, Stork PJ. (2003). PKA phosphorylation of Src mediates cAMP's inhibition of cell growth via Rap1. *Mol Cell*; 9: 85-94.
14. Weissman JT, Ma JN, Essex A, Gao Y, Burstein ES. (2004). G-protein-coupled receptor-mediated activation of rap GTPases: characterization of a novel Galphai regulated pathway. *Oncogene*; 23: 241-9.
15. Xie H, Ma F, Zhang YQ, Gao X, Wu GC. (2002). Expression of 5-HT (2A) receptor mRNA in some nuclei of brain stem enhanced in monoarthritic rats. *Brain Res*; 954: 94-9.
16. Marinissen MJ, Gutkind JS. (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci*; 22: 368-76.
17. McCoy KL, Hepler JR. (2009). Regulators of G protein signaling proteins as central components of G protein-coupled receptor signaling complexes. *Prog Mol Biol Transl Sci*; 86: 49-74.
18. Dorsam RT, Gutkind JS. (2007). G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*; 7: 79-94.
19. Johnston CA, Siderovski DP. (2007). Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins: current structural insights. *Mol Pharmacol*; 72: 219-30.
20. Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*; 63: 1256-72.

21. Morris MB, Dastmalchi S, Church WB. (2009). Rhodopsin: structure, signal transduction and oligomerisation. *Int J Biochem Cell Biol*; 41: 7214.
22. Sugita S, Ichtchenko K, Khvotchev M, Südhof TC. (1998) α -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: 32715–32724.
23. Araç D, Boucard AA, Bolliger MF, Nguyen J, Soltis SM, Südhof TC, Brunger AT. (2012) A novel evolutionarily conserved domain of cell-adhesion GPCRs mediates autoproteolysis; *EMBO J.*, 31: 1364 –1378.
24. Meza-Aguilar DG, Boucard AA. (2014). Latrophilins updated. *Biomol Concepts*; 5: 457-78.
25. Silva JP, Leliana VG, Ermolyuk YS, Vysokov N, Hitchen PG, Berninghausen O, Rahman MA, Zangrandi A, Fidalgo S, Tonevitsky AG, Dell A, Volynski KE, 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. USA*; 108: 12113–12118.
26. Collins MO, Husi H, Yu L, Brandon JM, Anderson CN, Blackstock WP, Choudhary JS, Grant SG. (2006). Molecular characterization and comparison of the components and multiprotein complexes in the postsynaptic proteome. *J Neurochem.* 97 Suppl; 1: 16-23.
27. Tobaben S, Südhof TC, Stahl B. (2000). The G protein-coupled receptor CL1 interacts directly with proteins of the Shank family. *J Biol Chem.* 275: 36204-10.
28. Kreienkamp HJ, Zitzer H, Gundelfinger ED, Richter D, Bockers TM. (2000). The calcium-independent receptor for α -latrotoxin from human and rodent brains interacts with members of the ProSAP/SSTRIP/Shank family of multidomain proteins. *J Biol Chem*; 275: 32387-90.
29. Feng K, Zhou XH, Oohashi T, Mörgelin M, Lustig A, Hirakawa S, Ninomiya Y, Engel J, Rauch U, Fässler R. (2002). All four members of the Ten-m/Odz family of transmembrane proteins form dimers. *J. Biol. Chem*; 277: 26128–26135.

30. Tobaben S, Südhof TC, Stahl B. (2002). Genetic analysis of α -latrotoxin receptors reveals functional interdependence of CIRL/latrophilin 1 and neurexin 1- β . *J. Biol. Chem*; 277: 6359–6365.
31. Langenhan T, Prömel S, Mestek L, Esmaeili B, Waller-Evans H, Hennig C, Kohara Y, Avery L, Vakonakis I, Schnabel R, Russ AP. (2009) Latrophilin signaling links anterior-posterior tissue polarity and oriented cell divisions in the *C. elegans* embryo. *Dev. Cell*; 17: 494–504.
32. Doyle SE, Scholz MJ; Greer KA, Hubbard AD, Darnell DK, Antin PB, Klewer SE, Runyan RB. (2006). Latrophilin-2 is a novel component of the epithelial-mesenchymal transition within the atrioventricular canal of the embryonic chicken heart. *Development dynamics*; 235: 3213–322.
33. Ribasés M, Ramos-Quiroga JA, Sánchez-Mora C, Bosch R, Richarte V, Palomar G, Gastaminza X, Bielsa A, Arcos-Burgos M, Muenke M, Castellanos FX, Cormand B, Bayés M, Casas M. (2011). Contribution of LPHN3 to the genetic susceptibility to ADHD in adulthood: a replication study. *Genes Brain Behav*; 10: 149-157.
34. 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, International Multicentre persistent ADHD CollaboraTion. (2012). The genetics of attention deficit/hyperactivity disorder in adults, a review. *Mol Psychiatry*; 17: 960-987.
35. Wallis D, Hill DS, Mendez IA, Abbott LC, Finnell RH, Wellman PJ, Setlow B. (2012). Initial characterization of mice null for Lphn3, a gene implicated in ADHD and addiction. *Brain Res*; 1463: 85-92.
36. White GR, Varley JM, 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: 3513-9.
37. Zhang S, Liu Y, Liu Z, Zhang C, Cao H, Ye Y, Wang S, Zhang Y, Xiao S, Yang P, Li J, Bai Z. (2014). Transcriptome profiling of a multiple recurrent muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder by deep sequencing. *PLoS One*; 9: e91466.

38. O'Sullivan ML, de Wit J, Savas JN, Comoletti D, Otto-Hitt S, Yates JR3rd, Ghosh A. (2012). FLRT proteins are endogenous latrophilin ligands and regulate excitatory synapse development. *Neuron*; 73: 903–910.
39. Oohashi T, Zhou XH, Feng K, Richter B, Mörgelin M, Perez MT, Su WD, Chiquet-Ehrismann R, Rauch U, Fässler R. (1999). Mouse ten-m/Odz is a new family of dimeric type II transmembrane proteins expressed in many tissues. *J. Cell Biol*; 145: 563–577.
40. Tucker, R. P., Chiquet-Ehrismann, R. (2006). Teneurins: a conserved family of transmembrane proteins involved in intercellular signaling during development. *Dev Biol*; 290: 237-245.
41. Dharmaratne N, Glendining KA, Young TR, Tran H, Sawatari A, Leamey CA. (2012). Ten-m3 is required for the development of topography in the ipsilateral retinocollicular pathway. *PLoS One*; 7: e43083.
42. Merlin S, Horng S, Marotte LR, Sur M, Sawatari A, Leamey CA. (2013). Deletion of Ten-m3 induces the formation of eye dominance domains in mouse visual cortex. *Cereb. Cortex*; 23: 763–774.
43. Suzuki N, Fukushi M, Kosaki K, Doyle AD, de Vega S, Yoshizaki K, Akazawa C, Arikawa-Hirasawa E, Yamada Y. (2012). Teneurin-4 is a novel regulator of oligodendrocyte differentiation and myelination of small-diameter axons in the CNS. *J. Neurosci*; 32: 11586–11599.
44. Matsushita H, Lelianova VG, Ushkaryov YA. (1999). The latrophilin family: multiply spliced G protein-coupled receptors with differential tissue distribution. *FEBS Lett*; 443: 348-52.
45. Koehnke J, Katsamba PS, Ahlsen G, Bahna F, Vendome J, Honig B, Shapiro L, Jin X. (2010). Splice form-dependence of β -neurexin/neurologin binding interactions. *Neuron*; 67: 61–74.
46. Boucard AA, Ko J, Südhof TC. (2012). High affinity neurexin binding to cell adhesion G-protein-coupled receptor CIRL1/latrophilin-1 produces an intercellular adhesion complex. *J. Biol. Chem*; 287: 9399–9413.
47. Krasnoperov VG, Bittner MA, Beavis R, Kuang, Salnikow KV, Chepurny OG, Little AR, Plotnikov AN, Wu D, Holz RW, Petrenko AG. (1997). α -Latrotoxin

stimulates exocytosis by the interaction with a neuronal G-protein-coupled receptor. *Neuron*; 18: 925–937.

48. Lelianova VG, Davletov BA, Sterlin A, Rahman MA, Grishin EV, Totty NF, Ushkaryov YA. (1997) α -Latrotoxin receptor, latrophilin, is a novel member of the secretin family of G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem*; 272: 21504–21508.
49. Davletov BA, Krasnoperov V, Hata Y, Petrenko AG, Südhof TC. (1995). High affinity binding of alpha-latrotoxin to recombinant neurexin I alpha. *J Biol Chem*; 270: p. 23903-5.
50. O'Sullivan ML, Martini F, von Daake S, Comoletti D, 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: p. 7.
51. Böttcher RT, Pollet N, Delius H, Niehrs C. (2004). The transmembrane protein XFLRT3 forms a complex with FGF receptors and promotes FGF signalling. *Nat. Cell Biol*; 6: 38–44.
52. Söllner C, Wright GJ. (2009). A cell surface interaction network of neural leucine-rich repeat receptors. *Genome Biol*; 10: R99.
53. Yamagishi S, Hampel F, Hata K, Del Toro D, Schwark M, Kvachnina E, Bastmeyer M, Yamashita T, Tarabykin V, Klein R, Egea J. (2011). FLRT2 and FLRT3 act as repulsive guidance cues for Unc5-positive neurons. *EMBO J*; 30: 2920–2933.
54. Maretto S, Müller PS, Aricescu AR, Cho KW, Bikoff EK, Robertson EJ. (2008). Ventral closure, headfold fusion and definitive endoderm migration defects in mouse embryos lacking the fibronectin leucine-rich transmembrane protein FLRT3. *Dev. Biol*; 318: 184–193.
55. Müller PS, Schulz R, Maretto S, Costello I, Srinivas S, Bikoff E, Robertson E. (2011). The fibronectin leucine-rich repeat transmembrane protein Flrt2 is required in the epicardium to promote heart morphogenesis. *Development*; 138: 1297–1308.

56. Chen, G., Burger, M., M. (2004). p150 overexpression in gastric carcinoma: the association with p53, apoptosis and cell proliferation. *Int J Cancer*; 112:393-8.
57. Fukumoto Y, Obata Y, Ishibashi K, Tamura N, Kikuchi I, Aoyama K, Hattori Y, Tsuda K, Nakayama Y, Yamaguchi N. (2010). Cost-effective gene transfection by DNA compaction at pH 4.0 using acidified, long shelf-life polyethylenimine. *Cytotechnology*; 62: 73-82.
58. Scholz N, Gehring J, Guan C, Ljaschenko D, Fischer R, Lakshmanan V, Kittel RJ, Langenhan T. (2015). The adhesion GPCR latrophilin/CIRL shapes mechanosensation. *Cell Rep*; 11: 866-74.

Anexo

Ensayos preliminares de la determinación de $[Ca^{2+}]_i$ en células HEK-293T en suspensión

Para evaluar si la activación del receptor latrofilina-1 (isoforma Lphn-1 ΔA , ΔB) por ligandos endógenos promueve cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ intracelular, se realizaron ensayos preliminares utilizando la técnica de espectrofluorimetría en células HEK-293T cargadas con Fura-2/AM.

Las células HEK-293 se sembraron en botellas de plástico T-75; una vez que alcanzaron la confluencia se lavaron con 3 ml de PBS y se cosecharon con PBS conteniendo 1 mM de EGTA. La suspensión se centrifugó a 800xg por 3 min y la pastilla se resuspendió en 3 ml de solución Krebs-Ringer Hepes (KRH, en mM: NaCl 127, KCl 3.73, $MgSO_4$ 1.18, KH_2PO_4 1.18, $CaCl_2$ 1.8, Hepes 20, D-glucosa 11, pH 7.3) conteniendo Fura-2/AM (2.5 μM), probenecid (0.5 mM) y BSA (10 mg/ml). Se incubó durante 30 min a 37°C en la oscuridad, se agregaron 3 ml de solución KRH fría para detener la reacción y se centrifugó (800xg, 3 min) para retirar el Fura-2 AM no incorporado.

La pastilla celular se resuspendió en 1 ml de solución KRH (4°C) con probenecid (0.5 mM) y los tubos fueron colocados sobre hielo en la oscuridad. Al momento del ensayo las muestras se centrifugaron a 800xg por 3 min y la pastilla se resuspendió en 1 ml de solución KRH/probenecid que se transfirió a una celda de cuarzo. Se cuantificó la fluorescencia por espectrofluorimetría a longitudes de onda de excitación de 340 y 380 nm, y una longitud de emisión de 510 nm.

Efecto de la activación de receptores muscarínicos en la $[Ca^{2+}]_i$.

Las células HEK-293T expresan de manera endógena receptores muscarínicos M_3 acoplados a proteínas $G_{\alpha q/11}$. La activación de estos receptores con el agonista carbacol (100 μM) indujo un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$. Este efecto fue mayor utilizando

alícuotas de 4 millones de células en comparación con el observado con 2 y 3 millones de células (Figura 1).

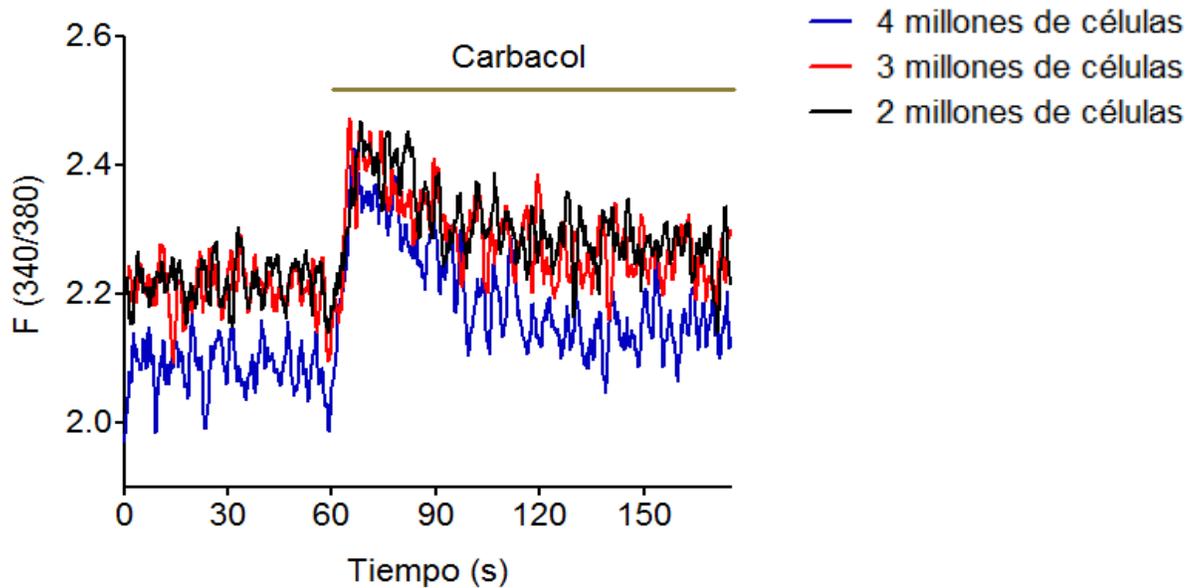


Figura 1. Análisis por espectrofluorometría de la activación de receptores muscarínicos en la $[Ca^{2+}]_i$ de células HEK-293T en suspensión. La línea indica la adición de carbacol (100 μ M como concentración final).

La Figura 2 muestra la fluorescencia máxima y mínima obtenidas al lisar las células con Tritón X-100 y quelar el Ca^{2+} con EGTA, respectivamente. Las respuestas indican que la cantidad de Fura-2 incorporado las células HEK-293T es adecuada.

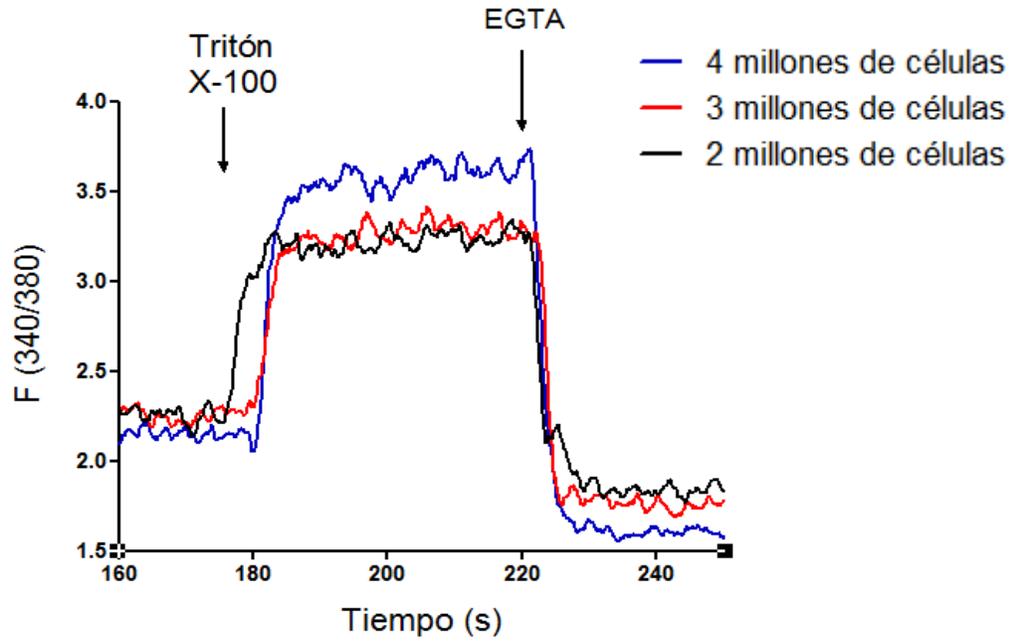


Figura 2. Determinación de la fluorescencia máxima y mínima en células HEK-293T en suspensión. Las respuestas máxima y mínima se obtuvieron al lisar las células con Tritón X-100 y quelar el Ca^{2+} con EGTA respectivamente.