



**Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados**

**del Instituto Politécnico Nacional**

**UNIDAD ZACATENCO**

**Departamento de Biología Celular**

**“Generación de una herramienta molecular para caracterizar  
la internalización del GPCR de adhesión Latrofilina 1”**

**T E S I S**

**Que presenta:**

**B.B.M. Sheila Ribalta Mena**

**Para obtener el grado de:**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOLOGÍA CELULAR**

**Director de la tesis:**

**Dr. Antony Boucard Jr.**

**Ciudad de México**

**julio del 2018.**

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

*Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haber otorgado la beca número 458488 para la realización de la Maestría en Ciencias con Especialidad en Biología Celular.*

## ***Agradecimientos***

*A mis papás Odalys Mena y Mario Ribalta por siempre apoyarme y confiar en mí.*

*A mi esposo Fidel L. Piñeiro por estar siempre acompañándome en mis aventuras y darme ánimos.*

*Al Dr. Antony Boucard Jr, por escogerme para compartir sus conocimientos y formación científica. Mil gracias por su apoyo académico y personal. Por su paciencia y su sonrisa en todo momento.*

*A los doctores Fernando Navarro y José E. Salazar por su tiempo y asesoría en este trabajo.*

*A mi hermana Jessica Osorio por como es. Que siga adelante en su vida y sea fuerte.*

*A mis familiares, suegros y amigos.*

*A mis compañeros del Laboratorio 54: Judith, Diana, José Carlos, Monserrat, Ana, Laura y Ricardo por su asesoría y apoyo; fue muy agradable trabajar con ustedes.*

*A mis compañeros de Posgrado especialmente a Alejandra, Karem, David, Carlos, Mijares, Laura, Kerlys ...*

*A mis compañeros de CUBA: Mileidys, Carlos, Kerlys, Ayme ...por todo su apoyo.*

*Al departamento de Biología Celular por aceptarme y enseñarme.*

*A Clarita por su calidez y preocupación.*

*A los compañeros del LANSE: Iván, Víctor por ayudarme en los ensayos de microscopía confocal y citometría de flujo.*

*A mis amigos mexicanos por siempre apoyarme e integrarme a su familia: Ester, Dany, Mary, Paty, Elo ....*

*A este maravilloso país, México, por abrirme las puertas .....*

***Dedicatoria***

*A todas las personas que creyeron en mí y ayudaron en mi formación académica y personal. En especial a mi mamita bella, mi papito y esposo. A todos ellos los amo mucho.*

*Sheila Ribalta Mena*

# Índice

<b>RESUMEN</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>1. Antecedentes</b> .....	<b>1</b>
1.1GPCR:.....	1
1.2GPCR de adhesión.....	3
1.3Latrofilinas.....	5
1.3.1 Latrofilina 1(LPHN1).....	7
1.4Neurexinas.....	7
1.5Desensibilización en los GPCRs.....	8
1.6Desensibilización homóloga en los GPCRs de adhesión.....	10
1.7SNAP como herramienta molecular.....	12
<b>2. Justificación</b> .....	<b>14</b>
<b>3. Hipótesis</b> .....	<b>14</b>
<b>4. Objetivos</b> .....	<b>15</b>
<b>4.1Objetivo General</b> .....	<b>15</b>
<b>4.2Objetivos específicos</b> .....	<b>15</b>
<b>5. Materiales</b> .....	<b>16</b>
5.1Cepas bacterianas.....	16
5.2Líneas celulares.....	16
5.3Soluciones y reactivos.....	16
5.4Sustratos, anticuerpos, fluoróforos y enzimas.....	19
5.5Kit, columnas y perlas.....	20
<b>6. Métodos</b> .....	<b>21</b>
6.1Estrategia Experimental.....	21
6.2Generación de LPHN1-SNAP <sup>N</sup> -HA.....	22
6.2.1 Obtención del fragmento del <i>SNAP</i> .....	22
6.2.2 Corte del inserto y vector con endonucleasas.....	23
6.2.3 Ligación del fragmento del <i>SNAP</i> con el vector.....	24

6.3 Transformación de la construcción generada en bacterias competentes .....	25
6.4 Miniprep y corte con endonucleasas.....	25
6.5 Midiprep.....	26
6.6 Transfección por polietilenimina (PEI).....	28
6.7 Extracción de proteínas totales.....	29
6.8 Extracción de proteínas de membrana .....	29
6.9 Western blot .....	30
6.10 Citometría de flujo.....	31
6.11 Microscopía confocal .....	32
6.12 Inmunofluorescencia y tinción para actina .....	32
6.13 Marcaje de superficie celular .....	33
6.14 Ensayo de internalización .....	34
6.15 Producción de ligandos sintéticos (Fc-IgG).....	36
6.15.1 Transfección por el método de fosfato de calcio .....	36
6.15.2 Purificación de ligandos sintéticos (Fc-IgG) .....	36
<b>7. Resultados</b> .....	39
7.1 Eficiencia de transfección en las células COS7 .....	39
7.2 Generación de la construcción LPHN1-SNAP <sup>N</sup> -HA.....	40
7.2.1 Amplificación del fragmento del <i>SNAP</i> .....	40
7.2.2 Corte con endonucleasas .....	42
7.2.3 Ligación .....	43
7.2.4 Secuenciación .....	46
7.3 Expresión de la construcción LPHN1-SNAP <sup>N</sup> -HA .....	47
7.4 Producción de ligandos sintéticos (Fc-IgG).....	52
7.5 Ensayo de marcaje de superficie celular.....	54
7.6 Ensayo de internalización.....	56
<b>8. Discusión</b> .....	60
<b>9. Conclusiones</b> .....	67
<b>10. Perspectivas</b> .....	68
<b>11. Literatura citada</b> .....	69

## RESUMEN

La familia de los receptores de adhesión (aGPCR) pertenece a los receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCRs). Los aGPCRs poseen como característica principal un extenso N-terminal con dominios de adhesión y un dominio de inducción de autoproteólisis del GPCR (dominio GAIN). La Latrofilina 1 (LPHN1), como aGPCR, presenta en su segmento N-terminal dominios de tipo lectina y olfactomedina que permiten la interacción con sus ligandos endógenos como las neurexinas. Las neurexinas son proteínas presinápticas involucradas en el mantenimiento de la sinapsis neuronal. Poco se conoce del mecanismo de regulación de los aGPCR por desensibilización e internalización. Este trabajo tiene como objetivo fundamental generar una herramienta molecular para caracterizar la internalización de la LPHN1. Para ello, se diseñó una estrategia molecular que permitió la inserción de la proteína SNAP en el extremo amino-terminal de la LPHN1, además de una bandera de hemaglutinina (HA) en la primera asa extracelular del receptor. La proteína resultante, LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA, fue expresada en células HEK293T y COS7, en las cuales los ensayos de inmunodetección de tipo Western detectaron la presencia de un patrón de bandas características de las LPHNs. Ensayos de inmunofluorescencia se utilizaron para analizar las propiedades de expresión, de unión a ligando y de regulación de LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA. En primer lugar, se detectó la expresión de LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA en la membrana celular con un patrón similar a la proteína control, LPHN1-HA. En segundo lugar, se observó la interacción entre la neurexina 1 $\beta$  y LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA, en la membrana celular. Finalmente, los ensayos de internalización identificaron un aumento de la señal intracelular de LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA inducido por su ligando. Nuestros resultados demuestran que se logró generar una herramienta para estudiar la internalización dependiente de ligando del receptor LPHN1.

## ABSTRACT

The family of adhesion receptors (aGPCR) belongs to the heterotrimeric G protein coupled receptors (GPCRs). The aGPCRs have as main characteristic an extensive N-terminal with adhesion domains and an induction domain of GPCR autoproteolysis (GAIN domain). Latrophilin 1 (LPHN1), as aGPCR, presents in its N-terminal segment lectin and olfactomedin-like domains that allow interaction with its endogenous ligands such as neurexins. Neurexins are pre-synaptic proteins involved in the maintenance of the neuronal synapse. Little is known about the mechanism of regulation of aGPCR by desensitization and internalization. This work has as its fundamental objective to generate a molecular tool to characterize the internalization of the LPHN1. To do this, a molecular strategy was designed that allowed the insertion of the SNAP protein in the amino-terminal end of the LPHN1, in addition to a haemagglutinin (HA) flag in the first extracellular loop of the receptor. The resulting protein, LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA, was expressed in HEK293T and COS7 cells, in which Western immunodetection assays detected the presence of a pattern of bands characteristic of LPHN. Immunofluorescence assays were used to analyze the expression, ligand binding and regulatory properties of LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA. First, the expression of LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA was detected in the cell membrane with a pattern similar to the control protein, LPHN1-HA. Secondly, the interaction between neurexin 1 $\beta$  and LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA was observed in the cell membrane. Finally, the internalization assays identified an increase in the intracellular signal of LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA induced by its ligand. Our results show that we were able to generate a tool to study the ligand-dependent internalization of the LPHN1 receptor.



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>%</b>	Porcentaje
<b>°C</b>	Grado Celsius
<b>7TM</b>	7 Segmentos transmembranales
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>BSA</b>	<i>Bovine Serum Albumins</i>
<b>Buffer TE</b>	<i>Buffer Tris-EDTA</i>
<b>Buffer TBST</b>	<i>Tris-buffer saline (TBS) y Tween 20</i>
<b>DAPI</b>	<i>4',6-diamino-2-fenilindol</i>
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>DPBS</b>	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGTA</b>	<i>Ethylene glycol-bis (<math>\beta</math>-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid)</i>
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>g</b>	Gramo
<b>HEPES</b>	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
<b>Kb</b>	Kilo bases
<b>kDa</b>	Kilo Daltons
<b>L</b>	Litro
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>mM</b>	Milimolar
<b>N</b>	Normal
<b>PA</b>	Fosfatasa alcalina
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PEI</b>	Polietilenimina

<b>PerCP</b>	<i>Peridinin chlorophyll protein</i>
<b>PFA</b>	Paraformaldeido
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SOB</b>	<i>Super optimal broth</i>
<b>SV40</b>	Virus del simio 40
<b>TSV40</b>	Antígeno T del virus del simio 40
<b>Venus</b>	Proteína verde fluorescente
<b>µg</b>	Microgramo
<b>µL</b>	Microlitro
<b>µM</b>	Micromolar

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs).	1
Figura 2.	Clasificación de los GPCRs.	2
Figura 3.	Esquema que representa la estructura de un GPCR de Adhesión.	4
Figura 4.	Características de las Latrofilinas.	6
Figura 5.	Características estructurales de las neurexinas.	8
Figura 6.	Desensibilización homóloga en los GPCRs.	10
Figura 7.	Sitios intracelulares de fosforilación de la Latrofilina 1.	11
Figura 8.	Endocitosis de la NRX1 $\beta$ por las células que expresan LPHN1.	12
Figura 9.	Reacción del SNAP con su sustrato Benzylguanine (BG).	13
Figura 10.	Eficiencia de transfección en las células COS7.	39
Figura 11.	Vector que contiene la secuencia del SNAP, pSNAPf.	41
Figura 12.	Amplificación del SNAP por PCR.	42
Figura 13.	Corte con la endonucleasa <i>Mlu</i> .	43
Figura 14.	Esquema representativo de ligación.	44
Figura 15.	Análisis <i>in silico</i> de la construcción LPHN1- SNAP <sup>N</sup> -HA.	44
Figura 16.	Obtención de la construcción LPHN1-SNAP <sup>N</sup> -HA.	45
Figura 17.	Secuenciación de la construcción LPHN1-SNAP <sup>N</sup> -HA.	47
Figura 18.	Expresión de la construcción LPHN1-SNAP <sup>N</sup> -HA en HEK293T y COS7 por Western Blot.	48
Figura 19.	Expresión de la construcción LPHN1-SNAP <sup>N</sup> -HA por Microscopía confocal.	49
Figura 20.	Células COS7 que expresan a Venus.	51
Figura 21.	Localización de la Latrofilina 1 en las células COS7 permeabilizadas.	52

Figura 22	Purificación de ligandos sintéticos.	53
Figura 23	Marcaje de superficie celular en células COS7.	55
Figura 24	Ensayo de internalización de la Latrofilina 1 en células HEK293T.	57
Figura 25	Índice de internalización.	59

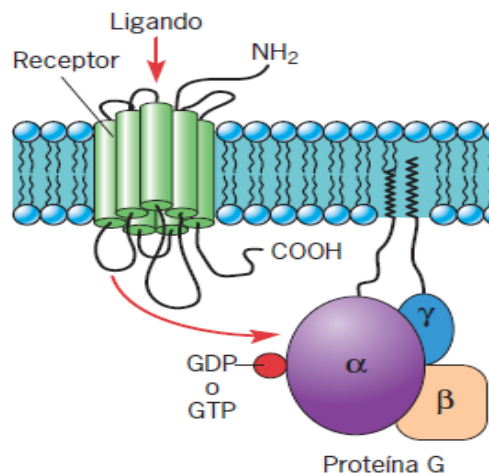
## LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Soluciones utilizadas en el trabajo de tesis.	17
Tabla 2.	Sustratos, anticuerpos y fluoróforos utilizados en el trabajo de tesis.	19
Tabla 3.	Enzimas utilizadas en el trabajo de tesis.	20
Tabla 4.	Kit, columnas, perlas y membranas utilizados en el trabajo de tesis.	20
Tabla 5.	Características de los oligos.	22
Tabla 6.	Componentes de la reacción de PCR.	23
Tabla 7.	Características de las etapas de PCR.	23
Tabla 8.	Restricción del inserto.	23
Tabla 9.	Restricción del vector.	23
Tabla 10.	Reacción de incubación con fosfatasa alcalina.	24
Tabla 11.	Ligación del control (-).	25
Tabla 12.	Ligación del <i>SNAP</i> .	25
Tabla 13.	Componentes de la reacción de corte con endonucleasas.	26
Tabla 14.	Cantidades empleadas en el método de transfección por PEI.	29
Tabla 15.	Fluoróforos empleados en Citometría de flujo.	31
Tabla 16.	Valores de significancia.	32
Tabla 17.	Parámetros de microscopía.	32
Tabla 18.	Fluoróforos empleados en microscopía.	32
Tabla 19.	Concentraciones y volúmenes empleadas en la solución de incubación del ligando para los ensayos de marcaje de superficie celular.	33
Tabla 20.	Concentraciones y volúmenes empleadas en la solución de incubación del ligando para los ensayos de internalización.	35

## 1. Antecedentes

### 1.1 GPCR

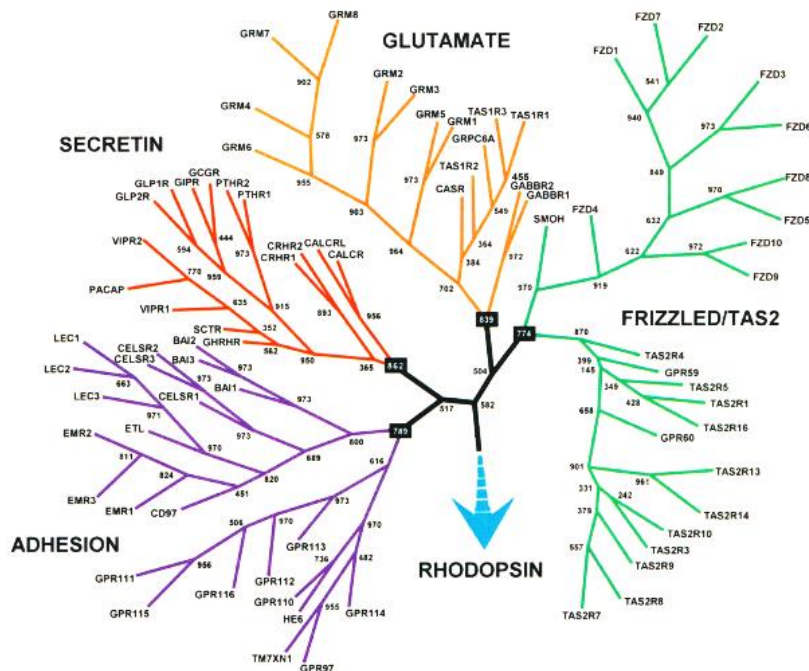
Los receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas (por sus siglas en inglés, GPCR) pertenecen a la mayor familia de receptores de superficie celular del genoma humano (Little et al., 2004, Hilger, 2018). La característica fundamental de los GPCRs, es que poseen siete segmentos transmembranales (por sus siglas en inglés, 7TM) en forma de alfa hélice. Estos receptores participan en disímiles rutas de señalización y tienen una gran diversidad de ligandos (SchiOTH and Fredriksson, 2005, Hilger, 2018). Además, su segmento citoplasmático no solo interactúa con las proteínas G sino también con cinasas, proteínas adaptadoras y arrestinas. Por tales motivos, esta superfamilia se encuentra dentro de los más frecuentes blancos de drogas terapéuticas (SchiOTH and Fredriksson, 2005) (Figura 1).



**Figura 1. Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs).** Esquema que representa un GPCR y su asociación con las proteínas G heterotriméricas (Giovana López, 2018).

Según el sistema de clasificación **GRAFS**, los GPCRs, se agrupan en cinco familias: **G**lutamato, **R**odopsina, **A**dhesión, **F**rizzled/Taste2 y **S**ecretina (Figura

2), las cuales se distinguen por su segmento N-terminal extracelular (Fredriksson et al., 2003). La familia de la Rodopsina es la más grande e incluye a todos los GPCRs clásicos y a cientos de receptores olfatorios. La familia del Glutamato se caracteriza por la forma lobular de su N-terminal, conocido como “atrapamoscas de Venus”. El grupo de los receptores Frizzled participan en procesos involucrados en el desarrollo de los metazoarios mediante señales secretadas por la glicoproteína Wnt. Los receptores TAS2 son levemente similares a los receptores Frizzled (Schiøth and Fredriksson, 2005, Bjarnadottir et al., 2004). La familia de la Secretina es conocida por unirse a grandes péptidos con acción paracrina (Bjarnadottir et al., 2004, Harmar, 2001), y la última familia está constituida por los GPCRs de adhesión. Este grupo de GPCR, es uno de las más recientemente formados y su función principal es que, como su nombre lo indica, poseen características estructurales distintivas que le permiten participar en procesos de adhesión celular (Schiøth and Fredriksson, 2005, Bjarnadottir et al., 2004).



**Figura 2. Clasificación de los GPCRs.** La clasificación **GRAFS** agrupa a los GPCRs en cinco familias fundamentales: **G**lutamato, **R**odopsina, **A**dhesión, **F**rizzled y **S**ecretina (Fredriksson et al., 2003).

La señalización de los GPCRs puede ser dependiente de proteínas G como su ruta clásica, o independiente de proteínas G, a través de cinasas de receptores acoplados a proteínas G (por sus siglas en inglés, GRKs) y arrestinas. En la señalización por la ruta clásica, el receptor activado potencia la separación de la subunidad  $G\alpha$  del dímero  $G\beta\gamma$  a consecuencia del intercambio de GDP por GTP.  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$  pueden señalar por diferentes rutas dependiendo del estímulo. La señalización es detenida cuando es hidrolizado el GTP y se reasocian las subunidades de las proteínas G. Por otra parte, en la ruta independiente de proteínas G, recientemente descrita, la activación del receptor potencia la afinidad para la fosforilación de serinas y treoninas en su cola citoplasmática por las GRKs (Hilger, 2018). El GPCR fosforilado es reconocido por las arrestinas y estas pueden mediar procesos como: desensibilización, internalización con degradación o reciclamiento, así como la activación mediante arrestina de proteínas efectoras río abajo como las proteínas cinasas activadas por mitógenos (por sus siglas en inglés, MAPK) y la familia de proteínas cinasas Src (Luttrell and Lefkowitz, 2002, Hilger, 2018).

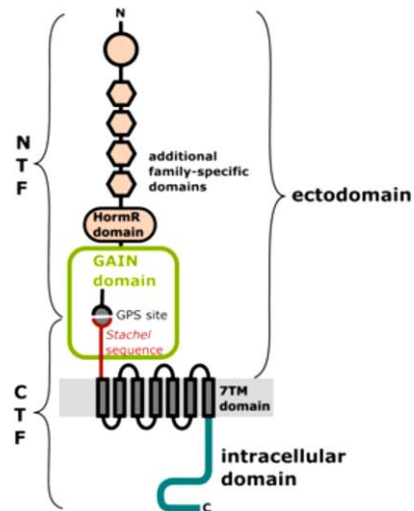
## 1.2 GPCR de adhesión

Los miembros de esta familia de GPCR estuvieron agrupados en la subfamilia B2 del grupo de las Secretinas. Sin embargo, posteriores estudios demostraron características distintivas que lo hicieron separarse y establecer el grupo de los GPCRs de adhesión (por sus siglas en inglés, aGPCRs) (Langenhan and Schoneberg, 2016, Harmar, 2001). Los aGPCRs están constituidos por 33 subfamilias en humanos y 31 en ratón; siendo una de las familias más numerosas de los receptores acoplados a proteínas G. En humanos los 33 miembros se agrupan en nueve subgrupos (I-IX) (Schiøth and Fredriksson, 2005, Langenhan and Schoneberg, 2016).

Entre las características distintivas de los aGPCRs, se encuentra la presencia de un extenso N-terminal con dominios similares a las proteínas de adhesión; como son: los dominios de cadherina, lectina, inmunoglobulina, olfactomedina, factor de crecimiento epidérmico (por sus siglas en inglés, EGF), laminina y



trombospondina. Además, poseen gran cantidad de serinas y treoninas que permiten formar glicosilaciones constituyendo un N-terminal altamente glicosilado (Langenhan and Schoneberg, 2016). Otra de las particularidades de los aGPCRs, es su dominio de Inducción de Autoproteólisis del GPCR (por sus siglas en inglés, GAIN) que posee el sitio de proteólisis del GPCR (por sus siglas en inglés, GPS) (Arac et al., 2012) ubicado en la zona yuxtamembranal de los receptores (Langenhan and Schoneberg, 2016). El dominio GAIN permite que la mayoría de los receptores sufran un proceso de proteólisis durante su maduración separándolos en los fragmentos N-terminal y C-terminal (por sus siglas en inglés, NTF y CTF) (Arac et al., 2012) (Figura 3). Dicho corte se conoce que es llevado a cabo en el retículo endoplasmático (Langenhan and Schoneberg, 2016).



**Figura 3. Esquema que representa la estructura de un GPCR de Adhesión.** Los aGPCRs durante su proceso de maduración sufren corte proteolítico en el sitio GPS ubicado en el dominio GAIN. Este corte divide al receptor en el fragmento N-terminal (NTF) y en el fragmento C-terminal (CTF). El NTF posee diferentes dominios de adhesión, un dominio de unión a hormona y un dominio GAIN. Mientras que el CTF está constituido por la región yuxtamembranal, 7TM y la cola citoplasmática. La secuencia *Stachel* comprende de 7 a 18 aminoácidos en el extremo N-terminal del CTF; los cuales son el resultado del corte autoproteolítico en el sitio GPS (Langenhan and Schoneberg, 2016).

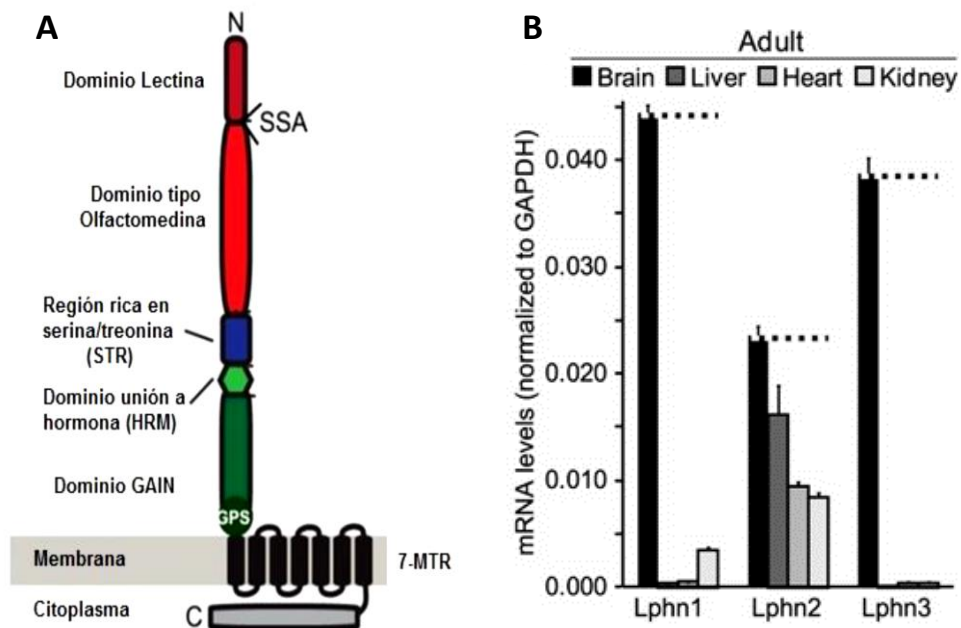
Los receptores de adhesión son expresados en la mayoría de los sistemas de órganos cumpliendo roles fisiológicos en el desarrollo, inmunidad, reproducción, funciones neuronales y epiteliales, así como en la tumorigénesis (Langenhan et al., 2013, Langenhan and Schoneberg, 2016, Aust et al., 2016). La mayoría de los aGPCRs son huérfanos (Bjarnadottir et al., 2004) y los ligandos identificados están generalmente unidos a membranas celulares o a la matriz extracelular. Como miembros de los GPCRs, los receptores de adhesión tienen asociación con las proteínas G heterotriméricas. Por mencionar solo algunos ejemplos, el GPR56 (involucrado en el desarrollo de la corteza cerebral) se acopla tanto a  $G\alpha_{12/13}$  como a  $G\alpha_{q/11}$ ; así como el GPR126 (involucrado en la regulación de la mielinización del nervio periférico) se asocia a  $G\alpha_s$  y  $G\alpha_q$  (Langenhan and Schoneberg, 2016).

### 1.3 Latrofilinas

El primer grupo de los aGPCRs está constituido mayoritariamente por la Latrofilina (por sus siglas en inglés, LPHN) y sus isoformas 1, 2 y 3. La Latrofilina fue descubierta como receptor independiente de calcio para la  $\alpha$ -Latrotoxina, toxina proveniente del veneno de la araña viuda negra que provoca la exocitosis en las células neuronales y neuro endocrina (Sugita et al., 1998).

Como un aGPCR, la Latrofilina está constituida en su NTF por dominios similares a las proteínas de adhesión (Figura 4A). La LPHN posee desde el N-terminal hasta el C-terminal: un dominio similar a lectina, seguido por un dominio similar a olfactomedina, una secuencia rica en serina/treonina, un dominio de unión a hormona y por último el dominio GAIN con el sitio GPS. Mientras que su CTF está constituido por la región 7TM con asas intracelulares y extracelulares y una cola citoplasmática con motivos de unión a dominios PDZ (Meza-Aguilar and Boucard, 2014). Durante la maduración de la proteína (LPHN), el corte ocurrido en el retículo endoplásmico, es requerido para su tráfico a la superficie celular. Igualmente, a la LPHN se le ha reconocido su asociación con proteínas G heterotriméricas ( $G\alpha_o$  y  $G\alpha_{q/11}$ , mas no a  $G\alpha_s$ ),

siendo la primera del grupo de los aGPCRs en ser reconocida (Silva and Ushkaryov, 2010, Lelianova et al., 1997, Langenhan and Schoneberg, 2016). Las LPHNs se encuentran distribuidas diferencialmente; mientras que la 1 y la 3 están mayoritariamente en cerebro, la localización de la 2 es más ubicua (Boucard et al., 2014, Sugita et al., 1998) (Figura 4B). Entre los principales ligandos endógenos de la LPHN identificados están las neurexinas, teneurinas y FLRT, familias de proteínas transmembranales que participan en procesos de adhesión (Meza-Aguilar and Boucard, 2014, Langenhan and Schoneberg, 2016).



**Figura 4. Características de las Latrofilinas. (A) Estructura de las Latrofilinas.** El NTF de las LPHN está constituido por un dominio de lectina, un dominio de olfactomedina, una región rica en serinas y treoninas, un dominio de unión a hormona y el dominio GAIN con el sitio GPS. Mientras que el CTF por el 7TM y la cola citoplasmática. **(B) Distribución de las tres isoformas de las Latrofilinas en el ratón adulto.** El mRNA de las tres isoformas se encuentra mayoritariamente en cerebro, no obstante, la isoforma 2 también se puede encontrar en otros tejidos. La distribución de las tres proteínas es similar a la de sus mRNAs correspondientes (Boucard et al., 2014).

Diferentes defectos genéticos de la LPHN se han vinculado con algunos desordenes humanos. Mutaciones sin sentido de la LPHN3 han sido

relacionadas con el desorden de hiperactividad y déficit de atención (por sus siglas en inglés, ADHD); así mismo se han asociado diferentes tipos de cánceres con mutaciones en las tres isoformas de la LPHN (Meza-Aguilar and Boucard, 2014).

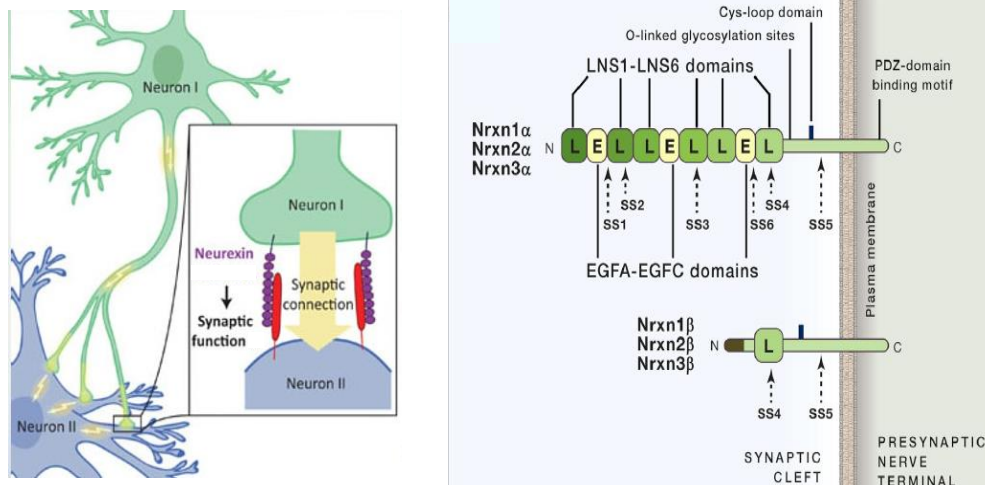
### 1.3.1 Latrofilina 1 (LPHN1)

A pesar del porcentaje de similitud de las tres isoformas, 48%-63%, la LPHN1 es la más estudiada por ser el principal receptor para la  $\alpha$ -Latrotoxina (Silva and Ushkaryov, 2010). Los ligandos endógenos para la isoforma 1 son: tenurina 2 y 4, FLRT3 y neurexina  $\alpha$  y  $\beta$ . Las teneurinas se unen con alta afinidad al dominio similar a lectina (Boucard et al., 2014), mientras que, FLRT3 y las neurexinas se unen a LPHN1 por el dominio de olfactomedina (Meza-Aguilar and Boucard, 2014). La unión de las teneurinas es dependiente del sitio de *splicing* A (SSA), ubicado entre los dominios de lectina y olfactomedina de la LPHN1 (Figura 4); sin embargo, SSA no afecta la unión del resto de los ligandos (Meza-Aguilar and Boucard, 2014, Boucard et al., 2014).

### 1.4 Neurexinas

Las neurexinas son moléculas de adhesión presinápticas de un solo paso transmembranal expresadas en neuronas que se unen a la  $\alpha$ -Latrotoxina en presencia de calcio. Las neurexinas son codificadas por tres genes (NRX1-3) los cuales están controladas por dos promotores ( $\alpha$  y  $\beta$ ) produciendo una isoforma larga (NRX  $\alpha$ ) y una isoforma corta (NRX  $\beta$ ). El NTF de las neurexinas está constituido por tres repetidos similares a EGF intercalados con seis dominios LNS (del inglés, *laminin/neurexin/sex-hormone-binding globulin domains*) para la forma larga. La forma corta de las NRXs solo contiene un dominio LNS. Ambas isoformas poseen una pequeña cola citoplasmática. Las NRX  $\alpha$  tienen seis sitios de *splicing* (SS1-SS6) mientras que las NRX  $\beta$  contienen dos (SS4-SS5) (Figura 5). Todas sus modificaciones post-traduccionales, unido a sus variantes genéticas hacen que se produzcan miles de combinaciones de NRXs (Meza-Aguilar and Boucard, 2014, Boucard et al., 2012, Sudhof, 2017).

Las NRXs solo se unen a la isoforma 1 de la Latrofilina por su sexto dominio LNS. La unión de las neurexinas a la LPHN1 es modulada por su sitio de *splicing* 4 (SS4) y su interacción es positiva siempre cuando este no se encuentra en las NRXs (Meza-Aguilar and Boucard, 2014, Sudhof, 2017).



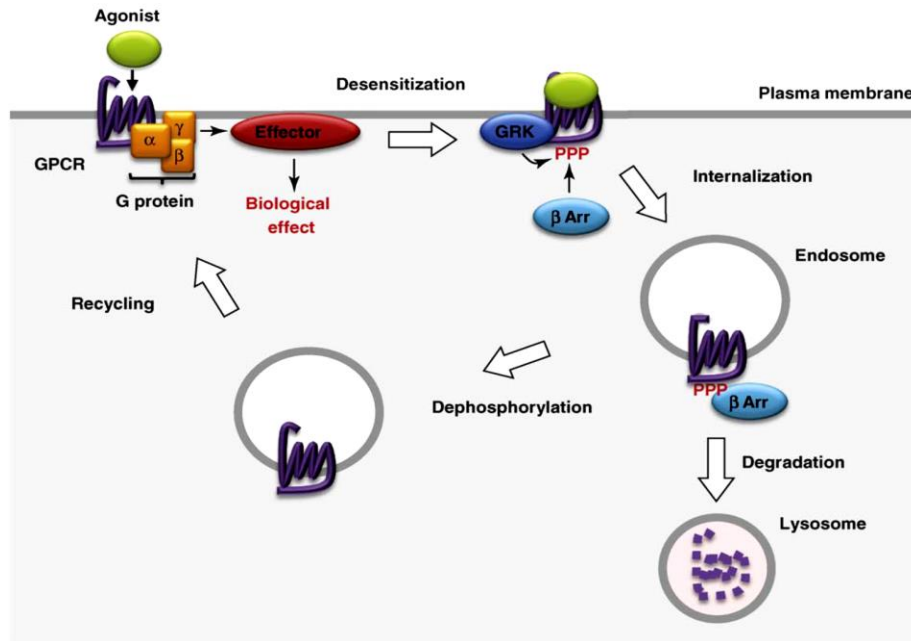
**Figura 5. Características estructurales de las neurexinas.** Las NRXs se expresan generalmente en neuronas y son codificadas por tres genes. Estos poseen un promotor río arriba (isoforma  $\alpha$ ) y río abajo (isoforma  $\beta$ ). La isoforma larga está formada por 6 dominios LNS, 3 dominios EGF, una región yuxtramembranal, un solo pase transmembranal y una pequeña cola citoplasmática. La isoforma corta solo contiene en su NTF un dominio LNS. Además, en las NRXs existen diversos sitios de *splicing* canónicos (Sudhof, 2017).

### 1.5 Desensibilización en los GPCRs

Entre los mecanismos de regulación reportados para los GPCRs se encuentra la desensibilización. La desensibilización es la no respuesta de los receptores o la disminución de esta ante la exposición prolongada de su agonista. Este mecanismo opera tanto a niveles del receptor como en su regulación río abajo (*downstream*) y es controlada por eventos de fosforilación. El mecanismo de fosforilación puede ser llevado a cabo por proteínas cinasas dependientes de segundos mensajeros, la proteína cinasa A y la proteína cinasa C (por sus siglas en inglés, PKA y PKC); o por las GRKs (Luttrell and Lefkowitz, 2002, Pierce et al., 2002).

La fosforilación mediada por PKA y PKC permite el desacople de los receptores con sus proteínas G y por ende son un mecanismo de regulación negativo clásico. Además, también pueden mediar formas de “desensibilización heteróloga” donde la activación de la cinasa por un tipo de receptor permite la fosforilación y desensibilización de otro tipo de receptor. Mientras que la regulación por las GRKs son un mecanismo muy particular para los GPCRs por medio del sistema GRK- $\beta$ -arrestina. Es conocida como “desensibilización específica de agonista” o “desensibilización homóloga” debido a que solo actúa si el receptor es activado o está en presencia de su agonista. Una vez fosforilado el receptor por las GRKs se les unen las moléculas de  $\beta$ -arrestina. La unión de las arrestinas impide un acople adecuado de las proteínas G heterotriméricas al receptor (Luttrell and Lefkowitz, 2002, Pierce et al., 2002) (Figura 6).

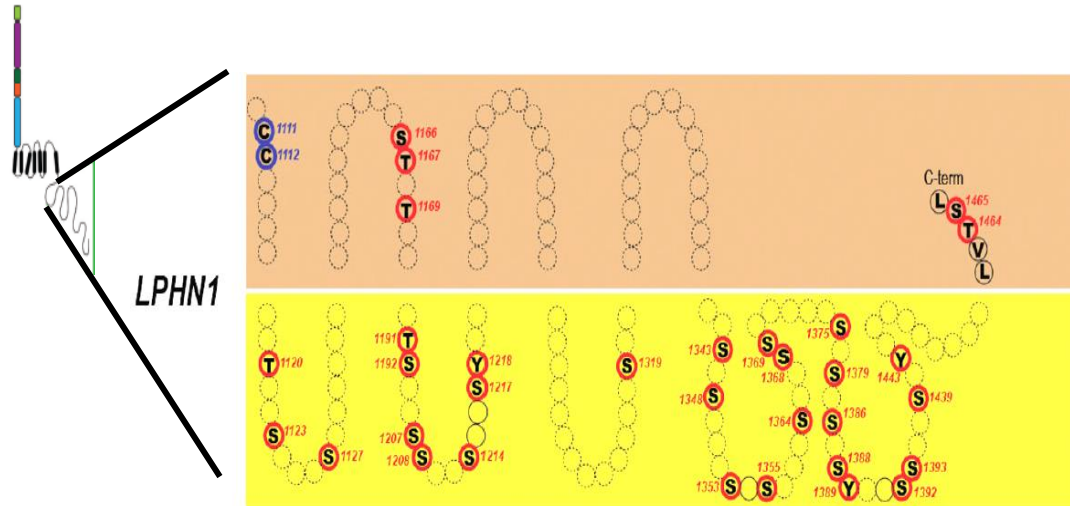
Posteriores procesos a la desensibilización homóloga pudieran ocurrir, como la internalización o secuestro, degradación y el reciclamiento o *downregulation*. En muchas ocasiones las  $\beta$ -arrestinas favorecen la internalización de los receptores por medio de las vesículas recubiertas de clatrina. Una vez internalizados los receptores en las vesículas endosomales pueden tomar diferentes rutas: degradación en los lisosomas, o bien reciclamiento a membrana por vía rápida o vía lenta (Luttrell and Lefkowitz, 2002, Pierce et al., 2002).



**Figura 6. Desensibilización homóloga en los GPCRs.** El agonista interacciona con su ligando y provoca un cambio conformacional que permite la señalización a través de las proteínas G heterotriméricas. La activación del receptor posibilita a su vez, que sea reconocido y fosforilado por las GRKs (principalmente en su cola citoplasmática). Las  $\beta$ -arrestinas interaccionan con el receptor fosforilado e impiden un acople adecuado de las proteínas G, produciendo un cese o una disminución de la señalización inicial. A este proceso dado por el par GRK- $\beta$ -arrestina se le denomina desensibilización homóloga. Una vez el receptor desensibilizado puede ser internalizado para su degradación o reciclamiento (Calebiro et al., 2010).

### 1.6 Desensibilización homóloga en los GPCRs de adhesión

Casi nada se conoce del proceso de desensibilización en los aGPCRs. Uno de los trabajos que evidencian una asociación de las  $\beta$ -arrestinas con un aGPCR es el realizado por Paavola y colaboradores en el 2011. En este, ellos demuestran que la forma truncada del GPR56 ( $\Delta$ NTGPR56), aumenta su actividad constitutiva, citotoxicidad celular y su asociación con  $\beta$ -arrestina 2 en comparación al receptor completo. Así mismo una co-transfección con  $\beta$ -arrestina 2 aumenta la internalización del  $\Delta$ NTGPR56 rescatando el fenotipo no citotóxico (Paavola et al., 2011).

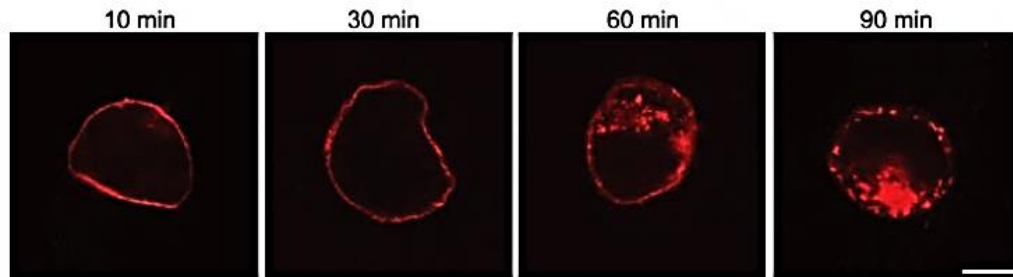


**Figura 7. Sitios intracelulares de fosforilación de la LPHN1.** Los círculos en rojo representan los posibles sitios de fosforilación (serinas, treoninas y tirosinas) en el tallo citoplasmático. Mientras que los círculos en azul representan probables sitios de palmitoilación (cisteínas) (Meza-Aguilar and Boucard, 2014).

En el caso de las LPHNs este proceso es desconocido. Sin embargo, desde el punto de vista estructural las tres isoformas de la LPHNs poseen en su cola citoplasmática secuencias de Ser/Thr/Tyr (principalmente la isoforma 1); las cuales pueden ser fosforiladas por las GRKs y posteriormente reclutar a las  $\beta$ -arrestinas (Meza-Aguilar and Boucard, 2014) (Figura 7). Otra evidencia que nos indica un posible mecanismo de desensibilización en las Latrofilinas es lo publicado por Boucard y colaboradores en el 2012. En este artículo las células HEK293T transfectadas previamente con LPHN1 fueron incubadas con la forma soluble de la neurexina 1 $\beta$  (IgNRX1 $\beta$ ). Al seguir a la neurexina por microscopía confocal a diferentes tiempos, se observó que en los primeros minutos la IgNRX1 $\beta$  se encontraba en membrana mientras que a partir de los 60 min disminuyó su densidad membranal y comenzó a aparecer en el citoplasma celular. Este fenómeno fue más marcado a los 90 min de incubación (Boucard et al., 2012). La internalización de la IgNRX1 $\beta$  por estas



células transfectadas con LPHN1 pudiera ser como resultado de un proceso de estimulación prolongada del ligando sobre el receptor (Figura 8).



**Figura 8.** Endocitosis de la NRX1 $\beta$  por las células que expresan LPHN1. Imagen que muestra, en rojo, la ubicación del ligando endógeno NRX1 $\beta$  a diferentes tiempos en células HEK293T transfectadas con LPHN1 (Boucard et al., 2012).

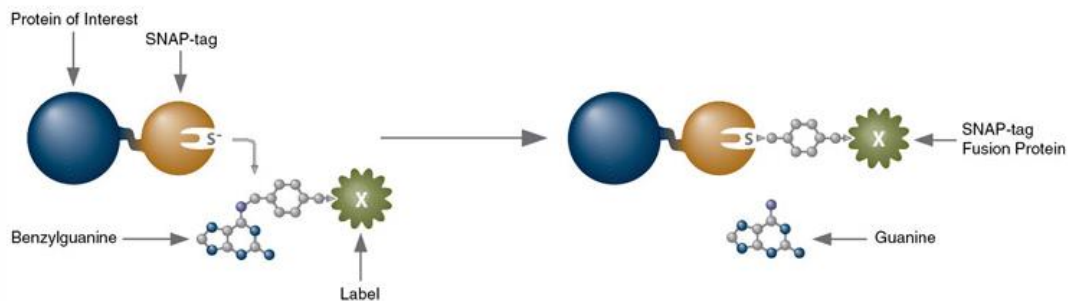
### 1.7 SNAP como herramienta molecular

La utilización de proteínas de fusión o dianas (*tag*) unidas a una proteína de interés para mejorar su caracterización es muy empleado en la biología. Sin embargo, las primeras de estas herramientas poseían diferentes inconvenientes que hacían limitado el estudio (Keppler et al., 2004). En los últimos años han surgido nuevas *tag* que posibilitan un mejor resultado y uno de los más versátiles es el SNAP-*tag*. El SNAP-*tag* es un mutante de 20 kDa de la proteína reparadora de ADN humana, alquiltransferasa O<sup>6</sup> alquilguanina (por sus siglas en inglés, hAGT). Esta enzima reacciona rápidamente, con alta especificidad y de manera covalente e irreversible con derivados de bencilguanina (BG) acoplados a una sonda (Keppler et al., 2003, Gautier et al., 2008).

El SNAP-*tag* posee características distintivas que le permite ser uno de los *tag* más utilizados en el marcaje de proteínas. Primero, la velocidad de reacción del SNAP-*tag* con su sustrato es independiente de la sonda a la que este unida el mismo, posibilitando una mayor variedad de sondas sintéticas (Keppler et al., 2004). Segundo, el SNAP-*tag* no posee restricciones en cuanto a la localización celular (Gautier et al., 2008) ni a su hospedero (Keppler et al.,

2003). Tercero, los sustratos del SNAP son químicamente inertes hacia otras proteínas lo que hace que exista poco marcaje inespecífico (Gautier et al., 2008). Cuarto, la reacción del SNAP con su sustrato posee una relación estequiométrica 1:1, garantizando la no formación de *clusters* artificiales entre las moléculas del sustrato. Por último, algunos de sus sustratos son no permeables lo que permite un marcaje específico de la proteína de interés (Bosch et al., 2014 ).

En la tecnología del SNAP-*tag* se ligan el ADN de la proteína de fusión con el del *SNAP* y se insertan en un vector. Posteriormente se transfecta el plásmido fusionado en las células y una vez la proteína expresada se incuba con el sustrato elegido (BG-sonda). Al interaccionar la enzima con su sustrato es liberado una molécula de guanina y el resto del sustrato se queda unido covalentemente (Gautier et al., 2008) (Figura 9).



**Figura 9. Reacción del SNAP con su sustrato *Benzylguanine* (BG).** El ADN de la proteína de interés es fusionado con el *SNAP* y una vez expresadas se adiciona el sustrato acoplado a una sonda. La enzima reconoce a su sustrato y al procesarlo facilita la unión covalente entre ellos. La proteína de interés puede ser seguida por la sonda acoplada a BG (New England BioLabs, 2018).

Esta herramienta es ampliamente utilizada en estudios de funcionalidad de proteínas: interacción proteína-proteína, estudios basados en fluorescencia (Keppler et al., 2004); así como, estudios de internalización y dimerización de GPCRs (Maurel et al., 2008, Levoye et al., 2015). Es por ello que nosotros hemos empleado esta herramienta para la caracterización de la desensibilización del receptor de adhesión LPHN1.

## **2. Justificación**

La regulación de los GPCRs desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis celular. Su estimulación por agonistas no solo inicia la cascada de transducción de señales mediada por el receptor, sino también desencadena la activación de los mecanismos celulares y moleculares de regulación, que conducen a la desensibilización del receptor y a su endocitosis.

Los aGPCRs son una de las familias de receptores menos estudiada y poseen como miembro característico a las Latrofilinas. Estas proteínas se expresan mayoritariamente en cerebro y participan en diferentes procesos de adhesión celular. Sin embargo, poco se ha descrito de ellas y de sus mecanismos de regulación. Por lo tanto, sería interesante, conocer su regulación una vez que interactúa con un agonista endógeno.

## **3. Hipótesis**

La internalización del GPCR de adhesión LPHN1, es producto de la interacción con su ligando endógeno neurexina 1 $\beta$ .

## **4. Objetivos**

### **4.1 Objetivo General**

Generar una herramienta molecular para caracterizar la internalización del GPCR de adhesión Latrofilina 1.

### **4.2 Objetivos específicos**

1. Optimizar el método de transfección por polietilenimina (PEI) para el receptor LPHN1 en células COS7.
2. Generar la construcción LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA.
3. Caracterizar la expresión de la construcción LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA.
4. Caracterizar la internalización del receptor LPHN1 al interactuar con su ligando endógeno, neurexina 1 $\beta$ .

## 5. Materiales

### 5.1 Cepas bacterianas

La cepa DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> de *Escehrichia coli* se utilizó para la transformación de las ligaciones y amplificación del ADN plasmídico.

Genotipo:

**DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>**: F-  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK-, mK+) *phoA supE44*  $\lambda$  - *thi-1 gyrA96 relA1*.

### 5.2 Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas fueron HEK293, HEK293T y COS7. Todas cultivadas bajo condiciones de esterilidad a 37°C y a una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Las células HEK293 son derivadas de riñón embrionario humano (*Homo sapiens*). Poseen una morfología epitelial y pueden ser transfectadas con ADN plasmídico con alta eficiencia. Al adicionarle el antígeno T de SV40 dio como resultado a la línea HEK293T, la cual posee mayor adhesión celular y mayor incremento de la eficiencia de transfección.

Las células COS7 son derivadas de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Poseen una morfología de fibroblastos y pueden ser transfectadas con ADN plasmídico con alta eficiencia. También contienen la secuencia de ADN del antígeno T de SV40.

### 5.3 Soluciones y reactivos

Las soluciones empleadas en este trabajo son descritas en la siguiente Tabla:

Tabla 1. Soluciones utilizadas en el trabajo de tesis.

Solución	Componentes	Características
<b>Medio LB</b>	Bacto triptona 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 10 g. Ajustar pH a 7.0. Aforar a 1 L con agua miliQ. Filtrar y esterilizar en autoclave.	Medio de Cultivo para bacterias (4°C).
<b>Solución de lisis 1</b>	50 mM de glucosa, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0, en agua miliQ. Filtrar y esterilizar en autoclave.	Extracción de ADN plasmídico (4°C).
<b>Solución de lisis 2</b>	0.2 N de NaOH, 1% de SDS; en agua miliQ.	Extracción de ADN plasmídico (22°C).
<b>Solución de lisis 3</b>	3 M de KCH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> , 11.5% de ácido acético; en agua miliQ. Filtrar y esterilizar en autoclave.	Extracción de ADN plasmídico (4°C).
<b>Buffer de carga 6X para ADN Polietilenglicol 13%</b> wt 8000 #Catálogo P5413	0.25% azul de bromofenol, 0.25% xileno cianol, 30% glicerol; en agua miliQ. 6.5 g de polietilenglicol, 4.67 g de NaCl; en 50 mL agua miliQ.	Electroforesis de ADN (-20°C). Purificación de ADN plasmídico (4°C).
<b>Buffer TE</b>	10 mM de Tris pH 8.0, 1 mM de EDTA pH 8.0; en agua miliQ.	Disolvente de ADN (22°C).
<b>Buffer TAE 1X</b>	40 mM de Tris-acetato, 1 mM de EDTA; en agua miliQ.	Geles de agarosa (22°C).
<b>SYBR® Safe 0.2% LIFE TECHNOLOGIES Ref S33102</b>	1 µL de SYBR® Safe en 50 mL de <i>buffer</i> de TAE 1X.	Identificación de las bandas de ADN en geles de agarosa (22°C).
<b>Bromuro de Etidio (750 ng/ml)</b>	3 µL (10 mg/mL) en 40 mL agua miliQ.	Identificación de las bandas de ADN en geles de agarosa (22°C).
<b>DMEM 10% con antibiótico</b>	10% de suero fetal bovino; glutamina 1X; 1% de mezcla de antibióticos (penicilina 10,000 U/mL; estreptomycin 10,000 µg/mL) en DMEM basal.	Cultivo celular (4°C).
<b>DMEM 20% sin antibiótico</b>	20% de suero fetal bovino; glutamina 2X; en DMEM basal.	Transfección por PEI (4°C).
<b>PBS 1X CORNING Ref 55-031</b>	9.55 g de DPBS en 1 L de agua miliQ. Filtrar y esterilizar.	Cultivo celular (4°C).
<b>Polietilenimina (PEI) 1 mg/mL 25000 monómeros</b>	Polietilenimina 1 mg/mL en PBS 1X. pH 4.5.	Transfección por PEI (4°C).
<b>Buffer de carga para electroforesis 1X</b>	50 mM de Tris-HCl pH 6.8, 100 mM de dithiothreitol, 2% de SDS grado electroforético, 0.1% de azul de bromofenol, 10% de glicerol.	Electroforesis de proteínas (-20°C).
<b>Buffer de corrida para electroforesis 1X</b>	3.02 g de TRIS-base, 18.8 g de glicina, 10 mL de SDS al 10%, aforar a 1 L con agua miliQ.	Electroforesis de proteínas (22°C).

<b>Buffer de transferencia 1X</b>	3.03 g de Tris base, 14.4 g de glicina, 200 mL de metanol, 25 mL de SDS pH 7.4. Ajustar el volumen a 1 L con agua destilada.	Western Blot (4°C).
<b>Rojo de Ponceau P3504</b> Sigma-Aldrich	0.5 g rojo ponceau en 500 mL ácido acético 5%	Western Blot (22°C).
<b>TBST 1X</b>	5 mL de TRIS-HCl 1 M pH 8.0, 4.38 g de NaCl, 0.25 mL de Tween20. Completar a 500 mL con agua miliQ.	Western Blot (22°C).
<b>BSA 3% en TBST</b> Sigma	0.75 g de BSA en 25 mL de TBST.	Western Blot (4°C).
<b>#Catálogo A-4503</b> <b>Inhibidor de proteasas 1X</b> Roche	1 pastilla de inhibidores en 1 mL de agua miliQ.	Western Blot de membranas (4°C).
Ref 11836145001 <b>Solución de luminol</b> GE Healthcare	500 µL de solución 1 y 500 µL de solución 2.	Western Blot (4°C).
Ref RPN2209 <b>Solución amortiguadora PMSF (100 mM)</b> Sigma	50 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4. 0.174 g de PMSF en 10 mL de etanol absoluto.	Purificación de ligandos (22°C). Purificación de ligandos (22°C).
<b>#Catálogo P7626</b> <b>EDTA 0.5 M PROBIOTEK</b> #Catálogo EB0185	46.53 g de EDTA en 250 mL de agua miliQ.	Purificación de ligandos (22°C).
<b>HEPES 1 M pH 7.4</b> CORNING	11.915 g de HEPES en 50 mL de agua miliQ. Ajustar a pH 7.4.	Trabajo con ligandos (22°C).
Ref 61-034-RO <b>Solución de MgCl<sub>2</sub> (4 M) en HEPES pH7.4</b> <b>HBS 2X</b>	40.66 g MgCl <sub>2</sub> en 50 mL de agua HEPES 1 M pH 7.4. 1.6 g NaCl, 0.074 g KCl, 0.0402 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 1 g HEPES y 0.2 g D-glucosa por cada 100 mL; pH 7.03 con NaOH. Filtrar y alicuotar.	Purificación de ligandos (22°C). Transfección por fosfato de calcio (-20°C).
<b>Cloruro de Calcio 2 M</b> Beker Analyzed	3.33 g CaCl <sub>2</sub> en 15 mL de agua miliQ.	Transfección por fosfato de calcio (4°C).
<b>Cloruro de magnesio 2 M</b> Sigma	6.099 g MgCl <sub>2</sub> en 15 mL de agua miliQ.	Transfección por fosfato de calcio (4°C).
Ref M2670 <b>Solución de cloroquina 25 mM</b> Sigma	0.13 g de cloroquina en 10 mL de PBS 1X. Filtrar y alicuotar.	Transfección por fosfato de calcio (-20°C).
<b>Solución de tritón 0.1%</b> Sigma	50 µL Tritón 100X en 49.95 mL en PBS 1X.	Permeabilizar células (22°C).
T-8787		

<b>PFA 4%</b> <b>Sigma Aldrich</b> #Catálogo P6148	4g de PFA, 100 µL de NaOH 2N en 100 ml de PBS 1X caliente. Ajustar pH a 7.4 y filtrar	Fijar células (-20°C).
<b>BSA 3% en PBS 1X</b> Biowest #Catálogo P6154	0.75 g de BSA en 25 mL de PBS 1X.	Tinción (-20°C).
<b>BSA 1% en PBS 1X</b> Biowest #Catálogo P6154	0.1 g de BSA en 10 mL de PBS 1X.	Tinción (-20°C).

---

## 5.4 Sustratos, anticuerpos, fluoróforos y enzimas

Tabla 2. Sustratos, anticuerpos y fluoróforos utilizados en el trabajo de tesis.

Reactivos	Compañía	Características
<b>SNAP Surface™ 549</b> (S9112S)	NEW ENGLAND BioLabs®	Sustrato del SNAP (-20°C).
<b>Anti-HA</b> #Catálogo 901514	BioLegend	Monoclonar de ratón clase IgG.
<b>Anti ratón acoplado a peroxidasa de rábano</b> #Catálogo 55550	MP coppel	Western Blot (4°C).
<b>Anti ratón acoplado a ALEXA 633</b> #Catálogo A21052	Thermo Fisher	Oscuridad, Tinción (4°C).
<b>Anti humano acoplado a ALEXA 488</b> #Catálogo A11013	Thermo Fisher	Oscuridad, Tinción (4°C).
<b>DAPI</b> #Catálogo D-1306	Thermo Fisher	Tinción (4°C).
<b>Faloidina</b> #Catálogo P-2141	Sigma Aldrich	Tinción (-20°C).



Tabla 3. Enzimas utilizadas en el trabajo de tesis.

Reactivos	Compañía	Características
<b>PrimeSTAR<sup>®</sup>HS DNA Polymerase</b> Alta fidelidad, baja tasa de errores (12 errores/250 Kb) #Catálogo R010A	TaKaRa	PCR (-20°C).
<b>Tripsina</b> #Catálogo EN013	In Vitro	Trabajo con células (-20°C).
<b>MluI</b> Ref R6381	Promega	Corte con endonucleasas (-20°C).
<b>BamHI</b> Ref R6021	Promega	Corte con endonucleasas (-20°C.)
<b>T4 DNA ligasa</b> #Catálogo M1801	Promega	Reacción de ligación (-20°C).
<b>Fosfatasa alcalina</b> Ref M182A	Promega	Eliminación de fosfatos (-20°C).
<b>RNasa A</b> Ref: 12091039	Invitrogen <sup>™</sup> UltraPure <sup>™</sup>	Purificación de ADN plasmídico (4°C).
<b>Lisozima</b> Ref:L6876	Sigma	Purificación de ADN plasmídico (4°C).

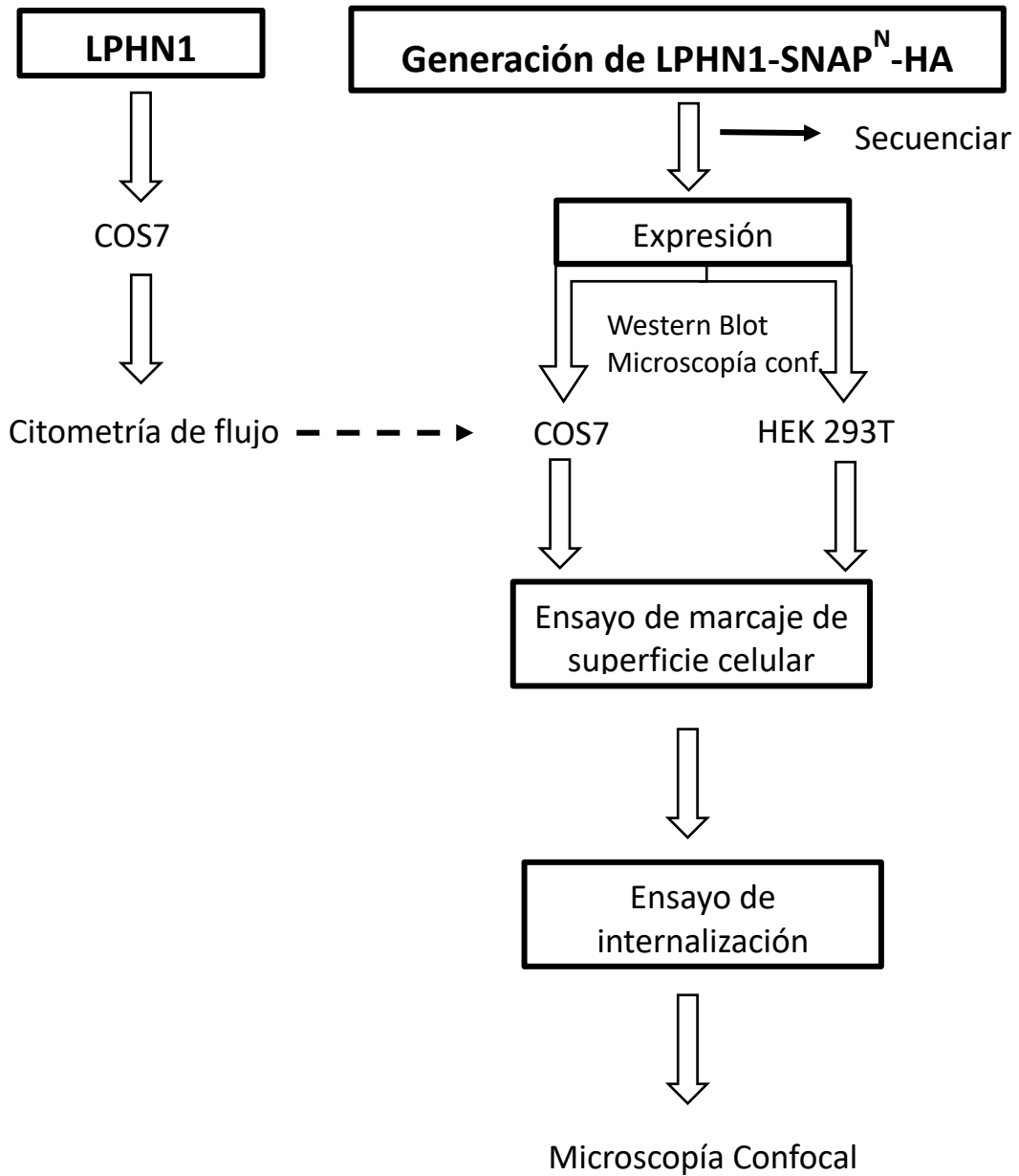
## 5.5 Kit, columnas y perlas

Tabla 4. Kit, columnas, perlas y membranas utilizados en el trabajo de tesis.

Reactivos	Compañía	Características
<b>PureYield<sup>™</sup>Plasmid Miniprep System</b>	Promega	Miniprep.
<b>QIAEX<sup>®</sup>II Gel Extraction Kit</b>	QIAGEN	Purificación de fragmentos para las reacciones de ligación.
<b>Columnas de centrifugación de pierce</b>	Thermo Scientific	Purificación de ligandos.
<b>Columnas de Amicon 50 K (Centrifugal Filter Devices)</b>	Merck Mlipore Ltd.	Purificación de ligandos.
<b>rProtein A Sepharose<sup>™</sup> Fast Flow</b>	GE Healthcare	Purificación de ligandos.
<b>Immobilon NC Transfer membrane 33 cm X 3 m</b> #Catálogo HATF00010	DynaLabs	Western Blot (22°C).

## 6. Métodos

### 6.1 Estrategia Experimental



## 6.2 Generación de LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA

### 6.2.1 Obtención del fragmento del *SNAP*

Con el objetivo de obtener la construcción deseada, primero se generaron los oligonucleótidos para amplificar el fragmento del *SNAP* utilizando el programa SerialCloner v2.6.1. Las características de los oligos se muestran a continuación en la siguiente Tabla:

**Tabla 5.** Características de los oligos.

Oligos	Secuencia	Proteína a amplificar	Propósito	Uso	Dirección	Longitud del oligo	Longitud del fragmento a amplificar	Tm(°C)
SR17001	TGCACGCGTATGGACAAAGAC	SNAP	Insertar el sitio de <i>MluI</i> en LPHN1	Usar con SR17002	Sentido	21	579	61.3
SR17002	AATACGCGTGGATCCGCCTG	SNAP	Insertar los sitios <i>MluI</i> y <i>BamHI</i> en LPHN1	Usar con SR17001	Anti-sentido	20	579	62.5

Secuencia de corte para la enzima *MluI*

Secuencia de corte para la enzima *BamHI*

Ambos cebadores poseen el sitio de corte para la enzima *MluI* (ACGCGT) y el SR17002, además, contiene un sitio para *BamHI* (GGATCC). Este último sitio nos permitirá identificar la dirección correcta del inserto una vez incorporado en el vector.

Posteriormente se realizó un PCR utilizando las condiciones mostradas en las Tablas 6 y 7. Empleamos como ADN molde al vector que contiene el gen del *SNAP*, pSNAPf, de 5 849 nucleótidos.

Tabla 6. Componentes de la reacción de PCR.

Componente	Cantidad ( $\mu\text{L}$ )
Agua mQ	14.55
Buffer 5X	5.0
dNTPs [10 $\mu\text{M}$ ]	2.0
ADN molde [1 ng/ $\mu\text{L}$ ]	1.0
Primer sentido [10 $\mu\text{M}$ ]	0.5
Primer anti-sentido [10 $\mu\text{M}$ ]	0.5
DMSO	1.25
Polimerasa	0.2
Volumen total	25.0

Tabla 7. Características de las etapas de PCR.

Etapas	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo (seg)
Desnaturalización inicial	98	180
Desnaturalización	98	10
Alineamiento	59	6
Elongación	68	36
Extensión final	68	420
Final	4	$\infty$
34 ciclos		

El amplicón obtenido se corrió en un gel de agarosa al 0.8% en presencia de SYBR<sup>®</sup>Safe. La banda correspondiente al fragmento del *SNAP* fue cortada y purificada por el kit de extracción de ADN QIAEX<sup>®</sup>II.

### 6.2.2 Corte del inserto y vector con endonucleasas

Posteriormente se pusieron en una reacción con endonucleasas tanto el fragmento del *SNAP* como el plásmido, LPHN1-SF<sub>11</sub>-HA. En este plásmido, GFP<sub>11</sub> se encuentra flanqueado por sitios de corte para la enzima *Mlu*I. La reacción tuvo un tiempo de duración de dos horas a 37 $^{\circ}\text{C}$  y fue agregada cada una hora, 0.5  $\mu\text{L}$  de enzima *Mlu*I. El plásmido LPHN1-HA producto del corte del plásmido LPHN1-SF<sub>11</sub>-HA, será denominado como vector. La secuencia de ADN del *SNAP* restringido (*SNAPr*), será denominada como inserto. Las condiciones empleadas para ambas reacciones son mostradas en las Tablas 8 y 9.

Tabla 8. Restricción del inserto.

Componente	Cantidad ( $\mu\text{L}$ )
<i>SNAP</i>	15.5
Buffer D 10X	2.0
BSA 10X	2.0
<i>Mlu</i> I	1.0
Volumen total	20.5

Tabla 9. Restricción del vector.

Componente	Cantidad ( $\mu\text{L}$ )
Agua mQ	13.0
LPHN1-SF <sub>11</sub> -HA [1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ]	2.0
Buffer D 10X	2.0
BSA 10X	2.0
<i>Mlu</i> I	1.0
Volumen total	20.0

Una vez finalizado, ambas reacciones fueron incubadas a 65°C por 20 min con el propósito de inactivar las enzimas contenidas en las muestras.

El inserto restringido fue purificado en solución, utilizando el kit de purificación QIAEX®II.

Únicamente el vector, LPHN1-HA, fue incubado por dos horas con fosfatasa alcalina a 37°C. Se añadió 1 µL de fosfatasa por cada hora de la reacción.

**Tabla 10.** Reacción de incubación con fosfatasa alcalina.

Componente	Cantidad (µL)
LPHN1- HA	20.0
<i>Buffer PA 10X</i>	2.4
<b>PA (1:100)</b>	2.0
<b>Volumen total</b>	24.4

Luego del tratamiento del vector con fosfatasa alcalina, la muestra se corrió en un gel de agarosa al 0.8% en presencia de SYBR®Safe. La banda correspondiente al vector fue cortada y purificada por el kit de purificación de ADN QIAEX®II.

En cada condición (vector e inserto) fue cuantificado el ADN obtenido por medio del equipo NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer.

### 6.2.3 Ligación del fragmento del *SNAP* con el vector

Para la reacción de ligación se utilizó la relación vector: inserto, 1:3. Empleamos 50 ng del vector y utilizamos la fórmula mostrada a continuación para calcular los nanogramos del inserto a utilizar.

$$\frac{ng\ vector \times Kb\ inserto}{Kb\ vector} \times \frac{x}{y} = ng\ inserto$$

ng vector: nanogramos del vector    Kb vector: kilobases del vector    x: número de veces del vector

ng inserto: nanogramos del inserto    Kb inserto: kilobases del inserto    y: número de veces del inserto

La relación vector: inserto fue puesta en una reacción de ligación cuyos componentes se muestran en las Tablas 11 y 12. La mezcla fue incubada a 16°C por 16 horas. El control negativo de ligación se realizó en el mismo tiempo y bajo las mismas condiciones de la muestra problema.

Tabla 11. Ligación del control (-).

Componente	Cantidad (μL)
Agua mQ	5.89
LPHN1- HA [50 ng]	2.11
Buffer de ligasa 10X	1.0
Ligasa	1.0
Volumen total	10.0

Tabla 12. Ligación del SNAP con LPHN1-HA.

Componente	Cantidad (μL)
Agua mQ	5.66
LPHN1- HA [50 ng]	2.11
SNAPr	0.23
Buffer de ligasa 10X	1.0
Ligasa	1.0
Volumen total	10.0

### 6.3 Transformación de la construcción generada en bacterias competentes

Una vez concluida la reacción de ligación se procedió a insertar el ADN de la construcción generada, LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA, en bacterias competentes.

Dos alícuotas de bacterias competentes DH5α (≈200 μL) fueron descongeladas en hielo-agua. Posteriormente le fue adicionado a una alícuota de bacteria la mezcla completa de la ligación problema y a la otro la mezcla completa de la ligación control (-). Ambos viales fueron mantenidos por 30 min en hielo-agua. Pasado este tiempo se incubaron a 42°C por aproximadamente 45 seg. Rápidamente fueron transferidos a un baño de hielo-agua para generar choque térmico por 2 min. A las alícuotas de bacterias, les fueron agregados 800 μL de medio LB estéril atemperado sin antibiótico y posteriormente incubadas a 37°C durante 1 hora con agitación (220 rpm). Pasado este tiempo, las alícuotas de bacterias transformandas (con el ADN) fueron concentradas a ≈10 000 gravedades por un min a 22°C y la pastilla obtenida fue resuspendida en 100 μL de medio LB. Las bacterias fueron sembradas por el método de inoculación por extensión en placas de medio LB con ampicilina [100 μg/μL]. Por último, las placas fueron incubadas a 37°C durante 16 horas.

### 6.4 Miniprep y corte con endonucleasas

Diez colonias al azar fueron seleccionadas de cada placa de medio LB con ampicilina [100 μg/μL]. Cada colonia fue sembrada en tubos de ensayos que contenían 3 mL de medio LB más ampicilina [100 μg/μL] por 8 horas a 37°C

con agitación (220 rpm). Pasado este tiempo, el ADN plasmídico es extraído y purificado con ayuda del kit PureYield™ Plasmid Miniprep System.

El ADN plasmídico obtenido se colocó en una reacción con la endonucleasa *BamHI*. Los componentes de esta reacción son mostrados en la Tabla 13. Posteriormente, los resultados de la restricción fueron corridos en un gel de agarosa al 0.8% por 45 min a 80 volts. El gel fue incubado por 30 min con solución de bromuro de etidio para visualizar el patrón de corte. Los ADNs plasmídicos que cumplieron correctamente con el patrón de corte fueron guardados y uno de ellos escogidos para su posterior amplificación.

**Tabla 13.** Reacción de corte con endonucleasas.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad (μL)</b>
<b>Agua mQ</b>	4.0
<b>BSA 10%</b>	1.0
<b>ADNp</b>	3.0
<b>Buffer E 10X</b>	1.0
<b><i>BamHI</i></b>	1.0
<b>Volumen total</b>	10.0

## 6.5 Midiprep

El ADN obtenido de la construcción LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA por miniprep, fue transformado en bacterias competentes DH5α. Las bacterias transformadas fueron sembradas en placas de medio LB con ampicilina [100 μg/μL]. Las placas se incubaron a 16 horas a 37°C. Posteriormente una colonia fue sembrada en un 1 mL de medio LB con ampicilina [100 μg/μL], durante 8 horas a 37°C con agitación constante (220 rpm). Subsecuentemente fueron transferidos 100 μL de la suspensión bacteriana a un matraz Erlenmeyer con 100 mL de medio LB con ampicilina [100 μg/μL]. El matraz fue mantenido durante 16 horas a 37°C con agitación constante (220 rpm). Pasado este tiempo el cultivo bacteriano se colocó en un tubo de policarbonato (50 mL) y se centrifugó a ≈13 000 gravedades durante 15 min a 4°C para sedimentar las bacterias. El sobrenadante fue desechado y se repitió este paso hasta finalizar con el cultivo bacteriano.

Una vez obtenida la pastilla bacteriana se procedió a la extracción del ADN plasmídico contenido en esta. La pastilla fue resuspendida en 3 mL de solución de lisis 1 mediante agitación por *vortex*. Posteriormente le fue agregada a la suspensión, 450  $\mu$ L de solución de lisozima, 6 mL de solución de lisis 2, 6 mL de cloroformo y 6 mL de solución de lisis 3, agitando cada vez que se agregaba una solución. La mezcla fue incubada en hielo durante 10 min y centrifugada a  $\approx 9\ 000$  gravedades durante 12 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se recuperó en otro tubo y se le añadieron 0.6 veces del volumen recuperado de isopropanol. La mezcla generada fue incubada a temperatura ambiente durante 10 min y centrifugada a  $\approx 9\ 000$  gravedades durante 12 min a 4°C. La pastilla obtenida fue lavada con 2 mL de etanol al 70% y posteriormente disuelta en 500  $\mu$ L de *buffer* TE.

Los 500  $\mu$ L obtenidos fueron transferidos a un tubo Eppendorf de 2 mL para comenzar la purificación del ADN plasmídico. A la muestra le fueron adicionados 500  $\mu$ L de LiCl (5 M) y luego fue agitada unos segundos en *vortex*. Seguidamente fue centrifugada a  $\approx 18\ 000$  gravedades durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y se le añadió igual volumen de isopropanol ( $\approx 1$  mL) con posterior incubación a 22°C durante 10 min. La mezcla se centrifugó a  $\approx 23\ 000$  gravedades durante 10 min a 4°C. La pastilla resultante fue lavada con 1 mL de etanol al 70% y luego fue disuelta en 500  $\mu$ L de *buffer* TE con RNAsa (20  $\mu$ g/ $\mu$ L). Seguidamente, la mezcla, fue incubada a 22°C durante 30 min y se le adicionaron 500  $\mu$ L de solución de polietilenglicol con posterior incubación a -20°C durante 20 min. Pasado este tiempo, fue centrifugada a  $\approx 23\ 000$  gravedades durante 15 min a 4°C. La pastilla resultante fue resuspendida en 500  $\mu$ L de *buffer* TE y se le adicionaron 500  $\mu$ L de una mezcla de fenol/cloroformo en relación 1:1 con posterior agitación en *vortex*. Posteriormente la mezcla fue centrifugada durante 5 min a  $\approx 23\ 000$  gravedades a 4°C. Al sobrenadante recuperado le fue agregado 500  $\mu$ L de cloroformo. Igualmente, la mezcla fue centrifugada durante 5 min a  $\approx 23\ 000$  gravedades a 4°C. Al sobrenadante recuperado se le adicionaron 120  $\mu$ L de acetato de amonio (10 M) y 2 veces el volumen de etanol absoluto (1 mL). La



mezcla fue agitada en *vortex* e incubada durante 10 min a 22°C. Posteriormente se centrifugó durante 12 min a  $\approx 23\ 000$  gravedades a 4°C. La pastilla se lavó con 2 mL de etanol al 70% y se disolvió en 200  $\mu$ L de *buffer* TE. Por último, el ADN obtenido fue cuantificado con ayuda del equipo NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer.

Para asegurarnos que el ADN plasmídico amplificado era el deseado, fue realizado una reacción de corte con la endonucleasa *Bam*HI tal cual se explicó en el punto anterior.

Posteriormente la construcción plasmídica obtenida fue secuenciada a través del equipo AB 3130 que emplea la Técnica de Sanger y Tecnología capilar. La secuenciación fue hecha en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA), San Luis Potosí.

## **6.6 Transfección por polietilenimina (PEI)**

Una vez obtenido el ADN se procedió a trabajar en las líneas celulares mencionadas anteriormente. El procedimiento de transfección utilizado en el laboratorio fue el siguiente.

En un tubo Eppendorf de 1.5 mL fue formado el complejo de transfección PEI-ADN en relación 3:1 ( $\mu$ L:  $\mu$ g). Posteriormente el complejo fue agitado en *vortex* por 30 seg e incubado por 30 min a 22°C (protegido de la luz). Pasado este tiempo las células fueron lavadas con PBS 1X y les fue adicionado el medio DMEM necesario para completar el volumen final del complejo de transfección. El complejo fue añadido gota a gota y las células fueron incubadas por 30 min a 37°C. Para completar el volumen final del pozo, se añadieron a las células, DMEM suplementado al 20% sin antibiótico. Las células fueron incubadas a 37°C por 16 horas. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS 1X y les fue añadido DMEM con antibiótico suplementado al 10% con SFB. Las células fueron mantenidas a 37°C hasta las 48 horas post-transfección. Las características de la transfección son mostradas en la Tabla 14.

Tabla 14. Cantidades empleadas en el método de transfección por PEI.

Placa	DMEM/pozo	ADN [1µg/ µL] /pozo	PEI/pozo	Volumen del complejo /pozo	Volumen total /pozo
24 pozos	121,1 µL	800 µL	2,4 µL	250 µL	500 µL
6 pozos	484 µL	4 µL	12 µL	1 mL	2 mL

Una vez las células transfectadas, se procedió a la realización de diferentes técnicas. Las cuáles serán mencionadas en los siguientes acápite.

### 6.7 Extracción de proteínas totales.

Luego de 48 horas de transfección, las cajas de 6 pozos fueron lavadas con PBS 1X. Posteriormente las células fueron mantenidas a -80°C por una hora y rápidamente fueron descongeladas a 37°C por 30 seg. Pasado este tiempo, a cada pozo le fue añadido ≈400 µL de *buffer* de carga para electroforesis de proteínas 1X y se levantaron las células con raspadores celulares. La mezcla obtenida fue colocada en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se pasaron 10 veces por jeringas de insulina. Para la extracción de proteínas de membrana, las células fueron incubadas por 30 min a 37°C, mientras que para la extracción de proteínas solubles las células fueron incubadas por 5 min a 95°C. Una vez realizado el procedimiento anterior las muestras estuvieron listas para ser corridas en un gel de poliacrilamida.

### 6.8 Extracción de proteínas de membrana

Luego de las 48 horas de transfección las células fueron lavadas con PBS 1X. Posteriormente las células fueron mantenidas a -80°C al menos por 30 min. Las células fueron descongelaron a 37°C por 30 seg y rápidamente transferidas a una mezcla de agua-hielo para generar choque térmico. A cada pocillo transfectado le fue añadido 1 mL de BSA al 0,1% en PBS 1X y 5 µL de inhibidor de proteasas 1X. Las células fueron levantadas con raspadores celulares y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL. La resuspensión celular fue centrifugada a ≈9 000 gravedades por 5 min a 4°C. La pastilla

obtenida contenía la fracción de membrana semipurificada de la fracción citosólica. A la pastilla celular le fue añadida 150  $\mu$ L de *buffer* de carga para electroforesis de proteínas 1X. Posteriormente, la pastilla fue pasada 10 veces por jeringas de insulina. Una vez realizado el procedimiento anterior las muestras estuvieron listas para ser corridas en un gel de poliacrilamida.

## 6.9 Western blot

Las proteínas extraídas con *buffer* de carga, fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 8%, el cual fue hecho según las indicaciones del *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Posteriormente las muestras fueron corridas en el gel concentrador, por 20 min a 80 volts y pasado este tiempo, en el gel separador por 70 min a 120 volts.

Una vez terminada la corrida se realizó la transferencia en cámara húmeda por tres horas a 250 mA o por 16 horas a 35 volts en una membrana de nitrocelulosa. El tiempo de transferencia escogido dependió de las características de la proteína a transferir. Seguidamente la membrana se tiñó por 3 min con rojo de Ponceau y se lavó tres veces con TBST por 10 min. La membrana fue bloqueada por dos horas con BSA al 3% en TBST 1X. Luego la membrana, fue lavada tres veces con TBST por 10 min y se incubó con el anticuerpo primario correspondiente, dilución 1:1000 en solución de bloqueo, por 24 horas a 4°C. Terminado el tiempo de incubación se realizaron tres lavados con TBST por 10 min. La membrana fue incubada con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (Hrp), dilución 1:2000 en la solución de bloqueo, durante 2 horas a temperatura ambiente. La membrana fue lavada tres veces con TBST por 10 min. Finalmente, la membrana fue colocada en un acetato con 1 mL de solución de luminol. Las bandas fueron reveladas en el equipo Odyssey con un tiempo promedio de exposición de 2 a 10 min. El marcador fue visualizado por el canal de 700 mientras que las bandas por el canal de quimioluminiscencia.

### 6.10 Citometría de flujo

Para la realización de esta técnica fueron sembradas alrededor de 500 000-750 000 células COS7 en placas de 24 pozos. Luego de 24 o 48 horas de la transfección por el método de PEI, las células fueron lavadas con PBS 1X. Posteriormente se levantaron con 100  $\mu$ L de tripsina y se mantuvieron por 4 min a 37°C. El volumen de los pozos fue completado con 400  $\mu$ L de PBS 1X. Los 500  $\mu$ L de suspensión fueron transferidos a tubos Eppendorf de 1.5 mL que contenían 500  $\mu$ L de PBS obteniendo un volumen final de 1 mL. Igualmente, se resuspendió para homogenizar la muestra.

Para el control de células muertas las células se incubaron a 75°C por aproximadamente 6 min.

Luego les fue adicionado a las células 1  $\mu$ L de Yoduro de propidio (incluyendo a las células muertas) para evaluar la viabilidad celular. Las células fueron mantenidas en frío y protegidas de la luz hasta su lectura. Las suspensiones celulares se transfirieron a tubos para citometría de flujo y se leyeron en el equipo FORTESSA tomando en cuenta 50 000 eventos por muestra.

El porcentaje de transfección correspondió al porcentaje de la población celular que poseían la señal fluorescente de la proteína Venus acoplada o no a la Latrofilina. Mientras que el porcentaje de viabilidad fue tomado como el porcentaje de la población celular que no presentaron la marca del Yoduro de Propidio. Los fluoróforos utilizados en estos experimentos son mostrados en la siguiente Tabla 15.

**Tabla 15.** Fluoróforos empleados en Citometría de flujo.

Fluoróforos	Ex/Em
FITC	492/518
PE	565/578
PerCP	590/675

Los resultados de citometría fueron procesadas en el programa GraphPad Prism v6. La prueba estadística utilizada fue la prueba de *t*. Los criterios de significancia empleados por este *test* son mostrados en la Tabla 16.

**Tabla 16.** Valores de significancia.

<b>P value</b>	<b>Significancia</b>
P > 0.05	ns
P ≤ 0.05	*
P ≤ 0.01	**
P ≤ 0.001	***
P ≤ 0.0001	****

ns: no significativo.

### 6.11 Microscopía confocal

Para los experimentos de microscopía se utilizó el microscopio confocal Sp8 de marca Leica. Las características del análisis de las muestras, así como de los fluoróforos son descritos en las Tablas 17 y 18.

**Tabla 17.** Parámetros de microscopía.

<b>Parámetros</b>	
<b>Tamaño</b>	1024 x1024
<b>Velocidad</b>	600 hertz
<b>Bidireccional</b>	si
<b>Espacio entre líneas</b>	0.4 µm
<b>Modo de lectura</b>	<i>Between Stacks</i>

**Tabla 18.** Fluoróforos empleados en microscopía.

<b>Fluoróforos</b>	<b>Ex/Em</b>	<b>Láser</b>	<b>Ganancia</b>
<b>DAPI</b>	345/455	405	500-800
<b>Faloidina</b>	547/572	552	800-1000
<b>Alexa 633</b>	631/650	638	600-700
<b>Alexa 488</b>	488/519	488	500-600
<b>FITC</b>	492/518	488	500-600
<b>SNAP Surface™ 549</b>	560/595	561	800-900

En la realización del protocolo de tinción las células HEK293T y COS7 fueron sembradas en cubreobjetos con diámetros correspondientes a placas de 24 pozos. Estos cubreobjetos fueron pretratados de 5 a 16 horas con medio condicionado fresco obtenido de las diferentes líneas celulares analizadas. Luego de 24 horas de sembradas las células en los cubreobjetos, estas fueron transfectadas por el método de PEI. Pasadas 48 horas de transfección las células fueron fijadas con PFA 4% por 15 min en frío y teñidas.

### 6.12 Inmunofluorescencia y tinción para actina

Luego de fijar las células, cada pozo fue lavado con PBS 1X frío y posteriormente permeabilizado con Tritón al 0.1% (≈500 µL) en PBS 1X durante 12 min a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas nuevamente con PBS 1X frío y bloqueadas con BSA 3% en PBS 1X por dos

horas a temperatura ambiente. Posteriormente a cada cubreobjeto le fue colocado  $\approx 35 \mu\text{L}$  del anticuerpo primario anti-HA disuelto en solución de bloqueo (1:200), por dos horas a temperatura ambiente en cámara húmeda. El anticuerpo remanente fue eliminado con PBS 1X frío. Seguidamente a los cubreobjetos le fue añadido,  $\approx 35 \mu\text{L}$  del anticuerpo secundario acoplado a Alexa 633 disuelto en solución de bloqueo (dilución 1:200), por dos horas en cámara húmeda y oscuridad. Pasado este tiempo, las células fueron lavadas tres veces con PBS 1X frío. En cada muestra se colocó  $\approx 35 \mu\text{L}$  de faloidina en BSA 1% en PBS 1X (dilución 1:150), por una hora a temperatura ambiente en oscuridad. El núcleo celular fue visualizado utilizando  $\approx 35 \mu\text{L}$  de DAPI en PBS 1X por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente fueron realizados dos lavados con PBS 1X frío para retirar el DAPI y un último lavado con agua miliQ. Finalmente, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con  $\approx 8 \mu\text{L}$  de medio de montaje (Gelvatol) y se sellaron las laminillas con esmalte de uñas. Las muestras fueron almacenadas en frío y protegidas de la luz hasta su lectura.

### 6.13 Marcaje de superficie celular

Pasado 48 horas de transfección, el medio de las células sembradas en placas de 24 pozos, fue sustituido por medio que contenía el ligando IgNRX1 $\beta$  (200 nM) o IgC (100 nM, como control negativo). Las células fueron incubadas con la solución de incubación del ligando por 16 horas a  $\approx 8^\circ\text{C}$ . Los componentes de la reacción son mostrados en la Tabla 19.

**Tabla 19.** Concentraciones y volúmenes empleadas en la solución de incubación del ligando para los ensayos de marcaje de superficie celular.

Ligandos	MgCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	HEPES-NaOH (pH 7.4)	BSA	DMEM	Volumen total /pozo
IgNRX1 $\beta$ (200 nM)	2 mM	2 mM	40 mM	0,01%	250 $\mu\text{L}$	250 $\mu\text{L}$
IgC (100 nM)	2 mM	2 mM	40 mM	0,01%	250 $\mu\text{L}$	250 $\mu\text{L}$

La solución de incubación del ligando es preparada en frío.

Culminado el tiempo de incubación, las células fueron lavadas con PBS 1X frío y fijadas con PFA 4% por 15 min en agua-hielo. Las células fueron lavadas nuevamente con PBS 1X frío y bloqueadas con BSA 3% en PBS 1X por dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente a cada cubreobjeto le fue colocado  $\approx 35 \mu\text{L}$  del anticuerpo primario anti-HA disuelto en solución de bloqueo (1:200), por dos horas a temperatura ambiente en cámara húmeda. Para retirar el exceso de anticuerpo, las células fueron lavadas dos veces con solución de bloqueo. Seguidamente le fue añadido a los cubreobjetos,  $\approx 35 \mu\text{L}$  del anticuerpo secundario acoplado a Alexa 633 disuelto en solución de bloqueo (dilución 1:200), por dos horas en cámara húmeda y oscuridad. Pasado este tiempo, las células fueron lavadas dos veces con solución de bloqueo. En cada muestra se colocó  $\approx 35 \mu\text{L}$  de anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488 disuelto en solución de bloqueo (1:500) por dos horas en cámara húmeda y oscuridad. El núcleo celular fue visualizado utilizando  $\approx 35$  de DAPI en PBS 1X por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó dos lavados con PBS 1X frío para retirar el DAPI y un último lavado con agua miliQ. Finalmente, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con  $\approx 8 \mu\text{L}$  de medio de montaje (Gelvatol) y se sellaron las laminillas con esmalte de uñas. Las muestras fueron almacenadas en frío y protegidas de la luz hasta su lectura.

#### **6.14 Ensayo de internalización**

Las células fueron sembradas en placas de 35 cm y una vez que alcanzaron el 80 o el 90% de confluencia, fueron transfectadas por el método de PEI. Después de 24 horas de transfección, las células fueron levantadas con 250  $\mu\text{L}$  de tripsina. Seguidamente les fue añadido a las células, 750  $\mu\text{L}$  de DMEM suplementado al 10%. De la suspensión celular fueron tomados  $\approx 150 \mu\text{L}$  posteriormente completados 100  $\mu\text{L}$  de DMEM suplementado al 10%. La dilución celular fue sembrada en placas de 24 pozos por 24 horas a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>/ 95% O<sub>2</sub>. Pasado este tiempo, el medio celular fue cambiado por 250  $\mu\text{L}$  de DMEM 10% (sin antibiótico) suplementado con el

sustrato del SNAP (SNAP Surface™ 549, dilución 1:1000, 1  $\mu$ M). Las células fueron incubadas por 30 min a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>/ 95% O<sub>2</sub> (protegidos de la luz). Una vez culminado los 30 min las células fueron lavadas tres veces con DMEM 10% e incubadas con la solución incubadora de ligando por dos horas a 37°C, en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>/ 95% O<sub>2</sub> (protegido de la luz) (Tabla 20).

Con el objetivo de detener la internalización celular, las células fueron colocadas en una mezcla de agua-hielo. Posteriormente las células fueron fijadas con PFA 4% por  $\approx$ 10 min en agua-hielo. Pasado este tiempo, las células fueron permeabilizadas con Tritón 0.1% por 10 min a temperatura ambiente. Las muestras fueron lavadas nuevamente con PBS 1X frío y bloqueadas con BSA 3% en PBS 1X por 30 min a temperatura ambiente. Seguidamente a los cubreobjetos le fue añadido,  $\approx$ 35  $\mu$ L del anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488 disuelto en solución de bloqueo (dilución 1:500), por una hora en cámara húmeda y oscuridad. Pasado este tiempo, las células fijadas fueron lavadas tres veces con solución de bloqueo y dos veces con PBS 1X. El núcleo celular fue visualizado utilizando  $\approx$ 35 de DAPI en PBS 1X por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron dos lavados con PBS 1X frío para retirar el DAPI y un último lavado con agua miliQ. Finalmente, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con  $\approx$ 8  $\mu$ L de medio de montaje (Gelvatol) y se sellaron las laminillas con esmalte de uñas. Las muestras fueron almacenadas en frío y protegidas de la luz hasta su lectura.

**Tabla 20.** Concentraciones y volúmenes empleadas en la solución de incubación del ligando para los ensayos de internalización.

Ligandos	MgCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	BSA	Volumen total /pozo(DMEM)
Sin ligando	2 mM	2 mM	3%	250 $\mu$ L
IgNRX1 $\beta$ (200 nM)	2 mM	2 mM	3%	250 $\mu$ L
IgC (100 nM)	2 mM	2 mM	3%	250 $\mu$ L



De las lecturas obtenidas fueron escogidas células únicas y se analizó la relación del número de píxeles intracelulares/ número de píxeles totales. Los píxeles fueron medidos en el Programa LAS AF Lite v4.3. La relación píxeles intracelulares/píxeles totales fue expresada en porcentaje y graficada en el programa GraphPad Prism.

## **6.15 Producción de ligandos sintéticos (Fc-IgG)**

### **6.15.1 Transfección por el método de fosfato de calcio**

En el método de transfección por fosfato de calcio, las células HEK 293 fueron sembradas en cajas de Petri de 10 cm DMEM conteniendo 10% de SFB y 1% de antibióticos. El medio de cultivo fue cambiado por 10 mL de DMEM/FBS (10%) con 25 mM de cloroquina, una vez que se alcanzó el  $\approx 80\%$  de confluencia. Las células fueron incubadas de 3 a 5 horas en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>/ 95% O<sub>2</sub>.

Posteriormente fue preparado en esterilidad, un tubo Eppendorf de 1.5 mL donde fue mezclado 25  $\mu$ g de ADN plasmídico codificante para las proteínas recombinantes (Fc-IgG o Fc-IgC) con 62  $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> (2 M) y 413  $\mu$ L de agua miliQ (tubo A). En otro tubo Eppendorf (tubo B) fue colocado 500  $\mu$ L de solución HBS 2X. A continuación, la mezcla fue transferida del tubo A al tubo B, gota a gota, mientras se agitaba suavemente en *vortex*. La mezcla resultante fue añadida inmediatamente a las células gota a gota y de manera uniforme sobre toda la caja celular. Las células fueron incubadas por 96 horas a 37 °C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>/ 95% O<sub>2</sub>. El pH del medio fue neutralizado con 200  $\mu$ L o 400  $\mu$ L de una solución de HEPES (1 M, pH 7.9).

### **6.15.2 Purificación de ligandos sintéticos (Fc-IgG)**

El medio de cultivo que contiene los ligandos solubles fue recuperado 4 días después de la transfección con fosfato de calcio, en tubos de policarbonato de 50 mL. Seguidamente los tubos fueron centrifugados a  $\approx 13\ 000$  gravedades durante 7 min para eliminar los restos celulares. El sobrenadante fue recuperado y le fue ajustado el pH, en caso de ser necesario, con una solución de HEPES 1 M (pH 7.4). Posteriormente, a la mezcla le fue añadida, PMSF

(inhibidor de serina- proteasas) y EDTA 1 mM. La mezcla fue incubada durante 24 horas a 4 °C con agitación suave en presencia de perlas de sefarosa unidas a proteína A (120 µL) y EGTA 1 mM. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la muestra fue centrifugada a ≈9 000 gravedades durante 5 min para separar el complejo formado por las proteínas unidas a las perlas de sefarosa, del sobrenadante. Seguidamente las perlas fueron lavadas tres veces con 1 mL de PBS 1X frío. Para eliminar las proteínas no unidas, las perlas fueron centrifugadas a ≈9 000 gravedades durante 5 min. La pastilla obtenida fue resuspendida en PBS 1X frío. Para separar los ligandos de la proteína A unida a las perlas de sefarosa, la suspensión fue colocada en columnas de Pierce (con filtro de fibra de vidrio). La suspensión fue lavada tres veces con HEPES (5 mM) centrifugando a ≈9 000 gravedades durante 5 seg a 4 °C. Para eluir las proteínas, las perlas fueron resuspendidas en 400 µL de una solución de HEPES (10 mM, pH 7.4) con 4 M de MgCl<sub>2</sub>. La mezcla resultante fue incubada por 8 min a temperatura ambiente y centrifugada a ≈9 000 gravedades por 5 seg (4 °C). Este procedimiento fue realizado 4 veces recuperando los eluidos (4 eluidos). Los eluidos fueron colocados en una columna Amicon con tamaño de poro de 50 kDa. El primer eluido fue centrifugado a máxima velocidad durante 15 min a 4 °C, el siguiente eluido durante 20 min, el tercer eluido durante 30 min y el último eluido por 30 min. Para eliminar el MgCl<sub>2</sub> y purificar los ligandos, el volumen remanente (≈50 µL) fue lavado 6 veces con una solución amortiguadora. En cada eluido, fueron colocados 400 µL de solución amortiguadora, y fueron centrifugados a máxima velocidad por diferentes tiempos. El primer eluido fue centrifugado por 15 min, el segundo por 8 min, y el tercero y el cuarto por 5 min. El volumen de solución remanente fue de ≈100 µL. Por último, la columna con el ligando purificado fue volteada en un nuevo tubo colector y centrifugada al máximo por 15 min a 4 °C.

Para la cuantificación de la concentración del ligando producido, fue cargado 1 µL en un gel de poliacrilamida al 8%, junto con 1 µL de diferentes concentraciones conocidas de BSA (0.5, 1, 2, 3, 4 µg/µL). El gel fue analizado

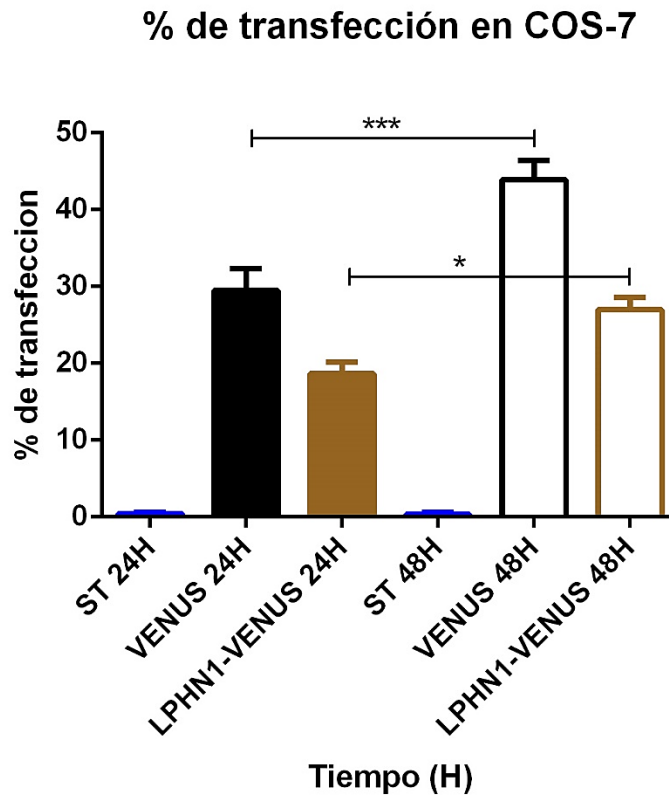
posteriormente por densitometría en el programa Image Studio v5.2. La pendiente de la curva obtenida de las concentraciones de BSA fue utilizada para calcular la concentración del ligando generado.

## 7. Resultados

### 7.1 Eficiencia de transfección en las células COS7

Con el objetivo de conocer la eficiencia de transfección por el método de PEI en las células COS7 se realizó citometría de flujo.

La Figura 10 muestra el porcentaje de transfección en las células COS7 para la proteína citoplasmática Venus y de membrana LPHN1 acoplada a Venus.



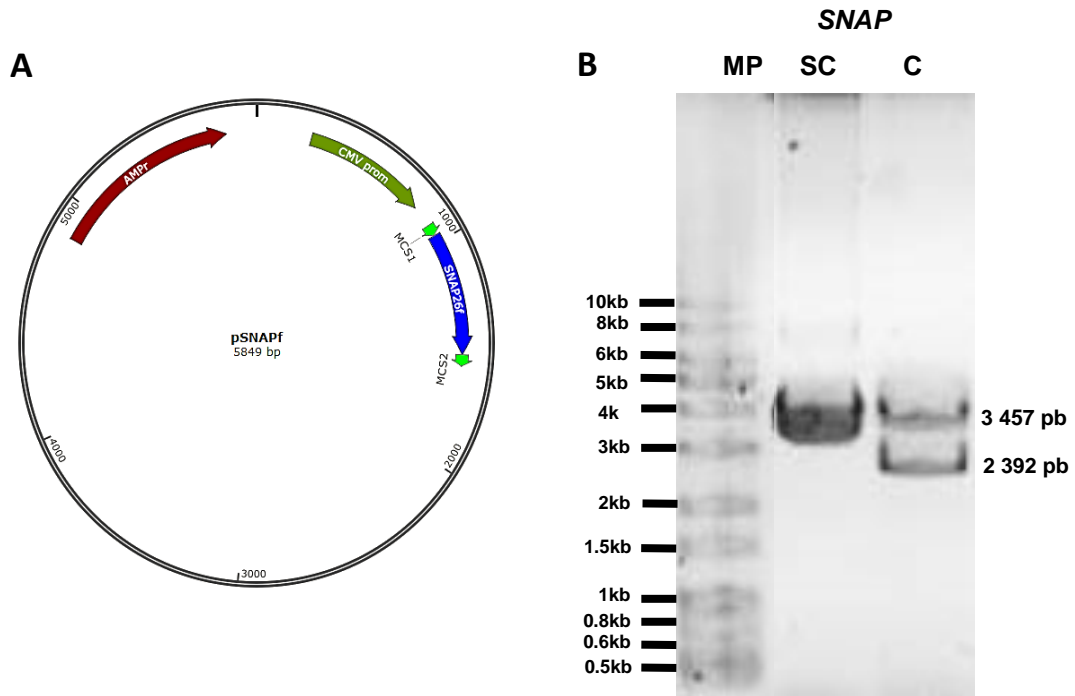
**Figura 10. Eficiencia de transfección en las células COS7.** Las células COS7 fueron sembradas en placas de 24 pozos y transfectadas con Venus y la LPHN1-Venus. Pasado 24 o 48 horas de transfección fue medida la eficiencia de transfección por citometría de flujo para ambas condiciones. Las muestras fueron leídas en el equipo FORTESSA tomando en cuenta 50 000 eventos por muestra. Las gráficas indican las medias  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. El análisis estadístico fue realizado mediante la prueba de  $t$ , ( $*P \leq 0.05$ ). ST corresponde a las células COS7 sin transfectar. ns: no diferencias significativas.

A las 24 horas el porcentaje de transfección para Venus fue del  $\approx 29.5\%$  mientras que a las 48 horas de un  $\approx 43.9\%$  con diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ). El patrón mostrado por la Latrofilina 1-Venus fue similar al patrón de Venus. A las 24 horas la población de células que expresó a la Latrofilina 1-Venus fue aproximadamente un  $18.6\%$ , mientras que a las 48 horas un  $26.9\%$ , con diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ). En ambas horas el porcentaje de transfección de Venus fue mayor que el de la Latrofilina 1-Venus. Las células sin transfectar no mostraron diferencias significativas. Para cada condición el porcentaje de viabilidad fue mayor del  $95\%$ . Este resultado se tomó en cuenta para los posteriores experimentos (Figura 10).

## **7.2 Generación de la construcción LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA.**

### **7.2.1 Amplificación del fragmento del *SNAP***

El vector que contiene el gen del *SNAP*, pSNAPf, con 5 849 pb fue utilizado como ADN molde para la amplificación del *SNAP*. Este plásmido posee un gen de resistencia a ampicilina (AMP<sup>r</sup>), una región con el promotor de citomegalovirus (CMV prom) y la secuencia del *SNAP* (SNAP26f) flanqueado por sitios múltiples de clonaje (MCS1 y MCS 2) (Figura 11A).



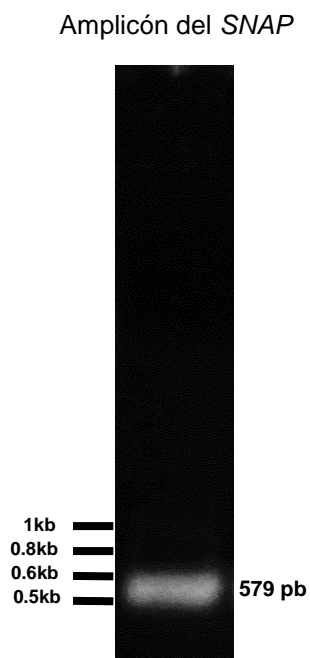
**Figura 11.** Vector que contiene la secuencia del *SNAP*, pSNAPf. (A) Representación esquemática del vector pSNAPf. La flecha azul indica la secuencia del *SNAP*. (B) Gel del plásmido, pSNAPf. El vector que posee la secuencia del *SNAP* fue cortado con las endonucleasas *EcoRI* y *XbaI* por 3 horas a 37°C. Posteriormente fue corrido el ADN procesado en un gel de agarosa al 0.8%. SC: sin cortar, C: cortada.

La Figura 11B muestra el resultado del corte con endonucleasas para el vector que contiene la secuencia del *SNAP*, pSNAPf, en un gel. Las enzimas utilizadas fueron *EcoRI* y *XbaI*. Como resultado de este ensayo se obtuvo los patrones de bandas esperados y predichos por la restricción virtual: una banda a  $\approx 3\ 457$  pb y otra a  $\approx 2\ 392$  pb.

Una vez comprobado que nuestro ADN molde es el correcto fue realizada la amplificación del fragmento deseado a través de un PCR convencional. Los oligos utilizados y las características de la reacción se encuentran en el acápite de los materiales y métodos.

El fragmento generado utilizando los oligonucleótidos SR17001 y SR17002, fue de 579 pb. Este fragmento correspondió a la secuencia del *SNAP* predicha por análisis *in situ*. La figura 12 muestra el gel de agarosa correspondiente al

amplificación del *SNAP* obtenido por PCR. Estos oligonucleótidos nos permitieron introducir los sitios de corte de las enzimas *MluI* y *BamHI* en la secuencia del *SNAP*.



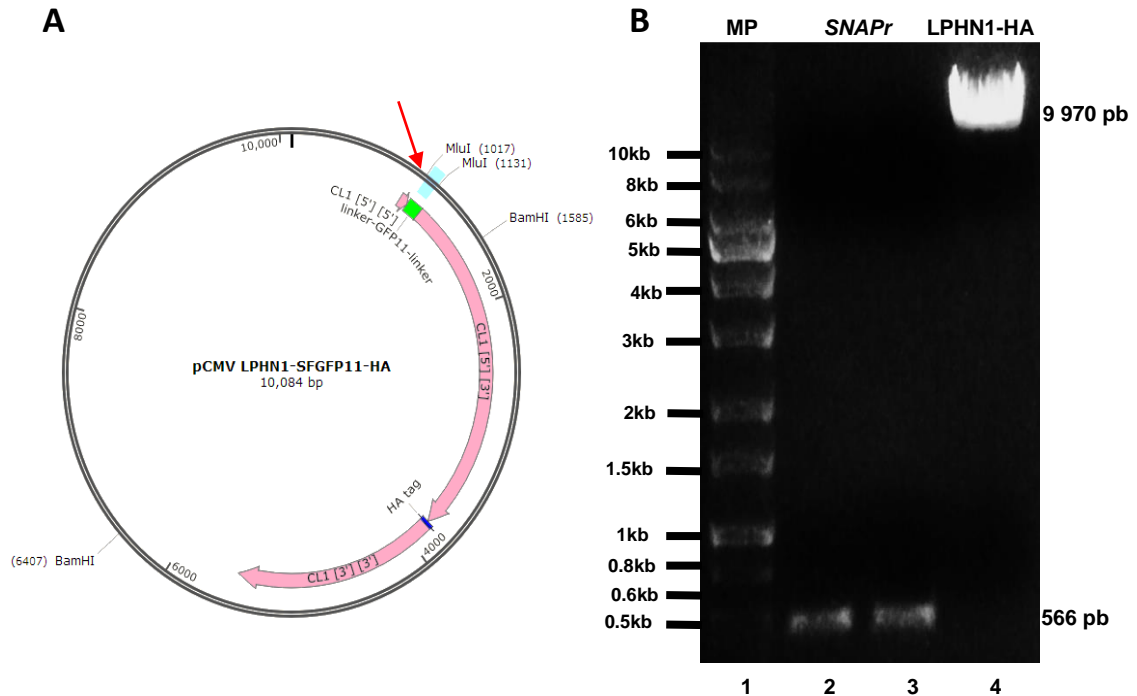
**Figura 12. Amplificación del *SNAP* por PCR.** El gen del *SNAP* fue amplificado por PCR utilizando los oligos SR17001 y SR17002. Posteriormente fue corrido el ADN amplificado en un gel de agarosa al 0.8%.

### 7.2.2 Corte con endonucleasas

Una vez obtenido el gen del *SNAP* se procedió a cortar con la endonucleasa *MluI*, al igual que el plásmido LPHN1-SFGFP<sub>11</sub>-HA (Figura 13A). En este plásmido la secuencia GFP<sub>11</sub>, está presente en el extremo N-terminal del NTF y a sus lados contiene sitios de corte para *MluI*. El fragmento GFP<sub>11</sub> tiene un tamaño de ≈114 pb.

El gel de la Figura 13B muestra los productos resultantes del corte con *MluI* tanto para el *SNAP* (carriles 2 y 3) como para el plásmido LPHN1-SFGFP<sub>11</sub>-HA (carril 4). El tamaño del *SNAP* restringido (*SNAPr*) es de ≈566 pb, mientras que el tamaño del LPHN1-SFGFP<sub>11</sub>-HA, sin el fragmento GFP<sub>11</sub>, es de ≈9 970

pb. La restricción del plásmido LPHN1-SF<sub>2</sub>GFP<sub>11</sub>-HA dio como producto de vector, LPHN1-HA.



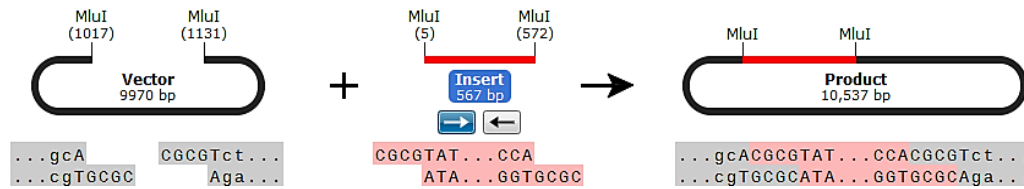
**Figura 13.** Corte con la endonucleasa *MluI*. **(A)** Representación esquemática del plásmido pCMV LPHN1-SF<sub>2</sub>GFP<sub>11</sub>-HA. La secuencia que codifica para LPHN1 es mostrada en color lila (CL1); en azul para HA y en verde para el fragmento GFP<sub>11</sub>. La flecha en rojo indica el fragmento que corta la endonucleasa *MluI*. **(B)** Productos resultantes del corte con la endonucleasa *MluI*. El ADN del plásmido LPHN1-SF<sub>2</sub>GFP<sub>11</sub>-HA y del fragmento del SNAP fueron cortados con la endonucleasa *MluI* por 3 horas a 37°C. Posteriormente fue corrido el ADN procesado en un gel de agarosa al 0.8%. LPHN1-HA corresponde al vector (carril 4), mientras que el SNAP restringido (SNAPr), al inserto (carriles 2 y 3).

Posteriormente fueron cortadas las bandas del gel, purificadas y el ADN resultante, del vector y del inserto, fue cuantificado. La cantidad de ADN obtenido del vector fue de 738 ng mientras que del inserto 240 ng.

### 7.2.3 Ligación

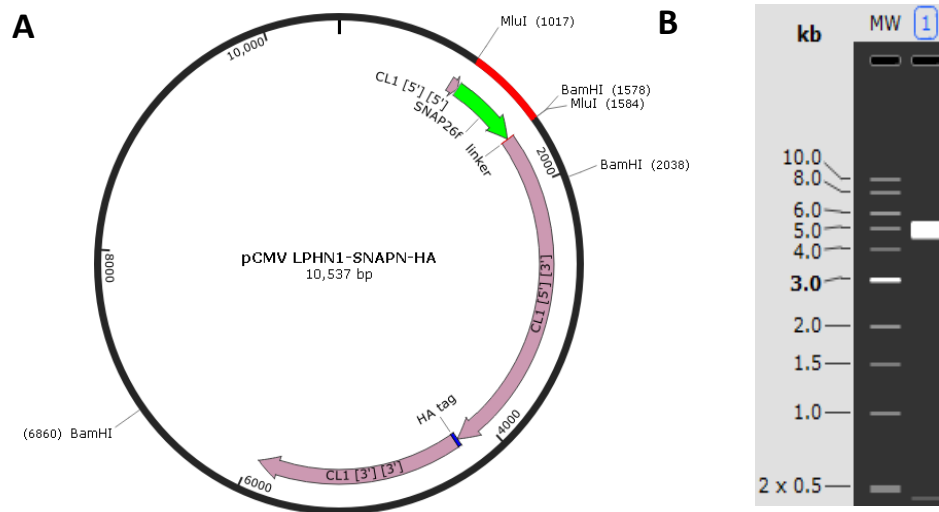
Para la reacción de ligación, primero realizamos la ligación *in silico* del vector y el inserto (Figura 14).





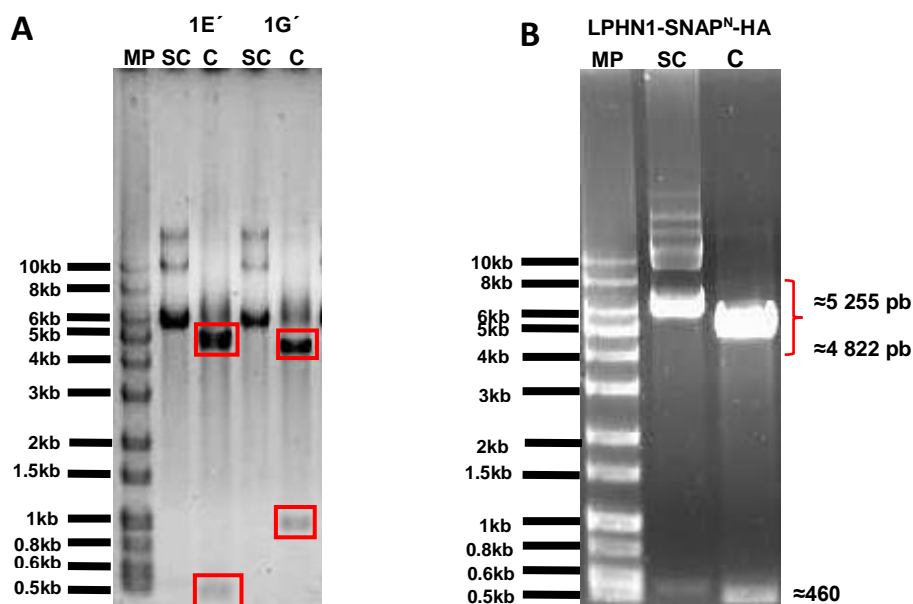
**Figura 14. Esquema representativo de ligación.** En negro la secuencia que corresponde al vector y en rojo la del inserto.

La Figura 15 muestra el análisis informático realizado para la construcción LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA. En **A** se encuentra el vector generado por el programa SnapGene y en **B** el resultado de la restricción virtual realizada por la endonucleasa *Bam*HI. Los resultados obtenidos por el programa SnapGene fueron corroborados por el programa SerialCloner v2.6.1. Ambos programas predijeron dos bandas alrededor de 5 000 pb y otra menor a 500 pb.



**Figura 15. Análisis *in silico* de la construcción LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA.** (A) Representación esquemática del plásmido pCMV LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA. La secuencia que codifica para LPHN1 es mostrada en color lila (CL1); en azul para HA y en verde para el fragmento del SNAP. El vector tiene un tamaño de ≈10 537 pb. (B) Análisis *in silico* del corte de la construcción LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA por la endonucleasa *Bam*HI. Se obtuvo dos bandas alrededor de 5 000 pb y otra menor a 500 pb.

Una vez concluido, el análisis *in silico*, procedimos a ligar 50 ng de vector (LPHN1-HA) con 8.57 ng de inserto (*SNAPr*), relación 1:3. El valor del inserto fue calculado por la fórmula descrita en el acápite de materiales y métodos. Si la secuencia del *SNAP* fue insertada correctamente, obtendremos el patrón correspondiente a una banda gruesa que contiene dos bandas de 5 255 y 4 822 pb cada una, y una banda más tenue de 460 pb. Si fue insertada de manera incorrecta, obtendremos una banda gruesa correspondiente a dos bandas de  $\approx 4\ 800$  pb y otra banda de 1 000 pb. En la Figura 16A, el ADN plasmídico de la colonia 1E' resultante de la miniprep, presenta la inserción del *SNAP* correcta, mientras el obtenido en la colonia 1G', presenta la inserción incorrecta (bandas señaladas en recuadros rojos). Estos resultados nos indican que obtuvimos la construcción deseada LPHN1-*SNAP*<sup>N</sup>-HA en la colonia 1E'. El corte fue realizado con la endonucleasa *Bam*HI.



**Figura 16.** Obtención de la construcción LPHN1-*SNAP*<sup>N</sup>-HA. (A) Resultado de la miniprep para la construcción LPHN1-*SNAP*<sup>N</sup>-HA. Las bacterias competentes DH5 $\alpha$  fueron transformadas por choque térmico con el ADN resultante de la ligación. Posteriormente sembradas en placas con medio LB con ampicilina [100  $\mu$ g/ $\mu$ L] por 16 horas a 37°C. Pasado este tiempo se tomó una colonia al azar y fue sembrada en 2 mL de medio LB con ampicilina [100  $\mu$ g/ $\mu$ L] por 16 horas a 37°C. El ADN plasmídico fue purificado y cortado con la endonucleasa *Bam*HI. Por último, fue corrido el ADN procesado en un gel de

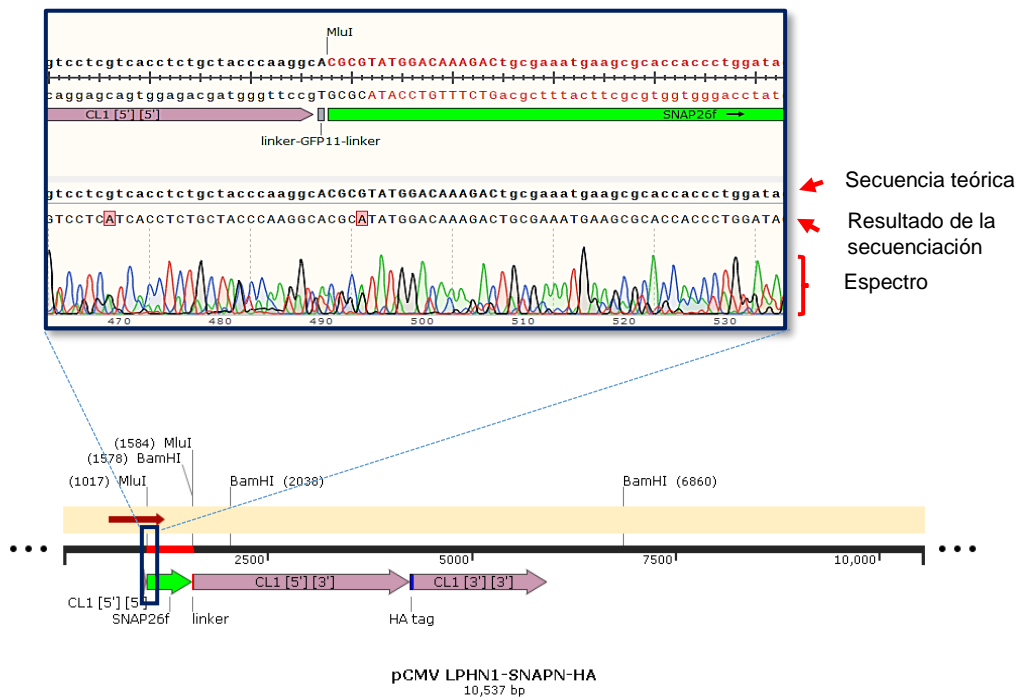
agarosa al 0.8%. Las bandas obtenidas son mostradas en recuadros rojos. **(B) Resultado de la midiprep para la construcción LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA.** Las bacterias competentes DH5 $\alpha$  fueron transformadas por choque térmico con el ADN resultante de la miniprep. Posteriormente sembradas en placas con medio LB con ampicilina [100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ] por 16 horas a 37°C. Pasado este tiempo se tomó una colonia al azar y fue sembrada en 2 mL de medio LB con ampicilina [100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ] por 16 horas a 37°C. De la suspensión bacteriana fueron tomados 100  $\mu\text{L}$  y se sembraron en 100 mL de medio LB con ampicilina [100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ] por 16 horas a 37°C con agitación constante. El ADN plasmídico fue purificado y cortado con la endonucleasa *Bam*HI. Por último, fue corrido el ADN procesado en un gel de agarosa al 0.8%. SC: sin cortar, C: cortada.

De las colonias que dieron el patrón esperado, una fue escogida y amplificada por el método de midiprep. Igualmente, obtuvimos una banda gruesa que contiene dos bandas de 5 255 y 4 822 pb cada una, y una banda más tenue de 460 pb como resultado del corte con *Bam*HI (Figura 16B). El ADN de la construcción fue cuantificado y guardado hasta su posterior utilización.

#### 7.2.4 Secuenciación

Para comprobar que el ADN de la construcción generada es el correcto, este fue secuenciado por el método de Sanger en el "Laboratorio Nacional de Tecnología Agrícola, Médica y Ambiental", en San Luis Potosí.

Se obtuvieron 32 *mismatches*, 0 *gaps* y 780 pb alineados. Los resultados obtenidos mostraron un alto porcentaje de homología entre la secuencia *in silico* de LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA y la secuenciada producto de la secuenciación (Figura 17). Con los oligos utilizados se logró secuenciar el N-terminal del *SNAP* y el C-terminal del péptido señal de la LPHN1 (CL1 [5'] [5']). La correcta incorporación del inserto es observada por la inserción del sitio de corte para la enzima *Mlu*I y no para *Bam*HI. Los resultados de secuenciación demuestran la generación de la construcción LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA.

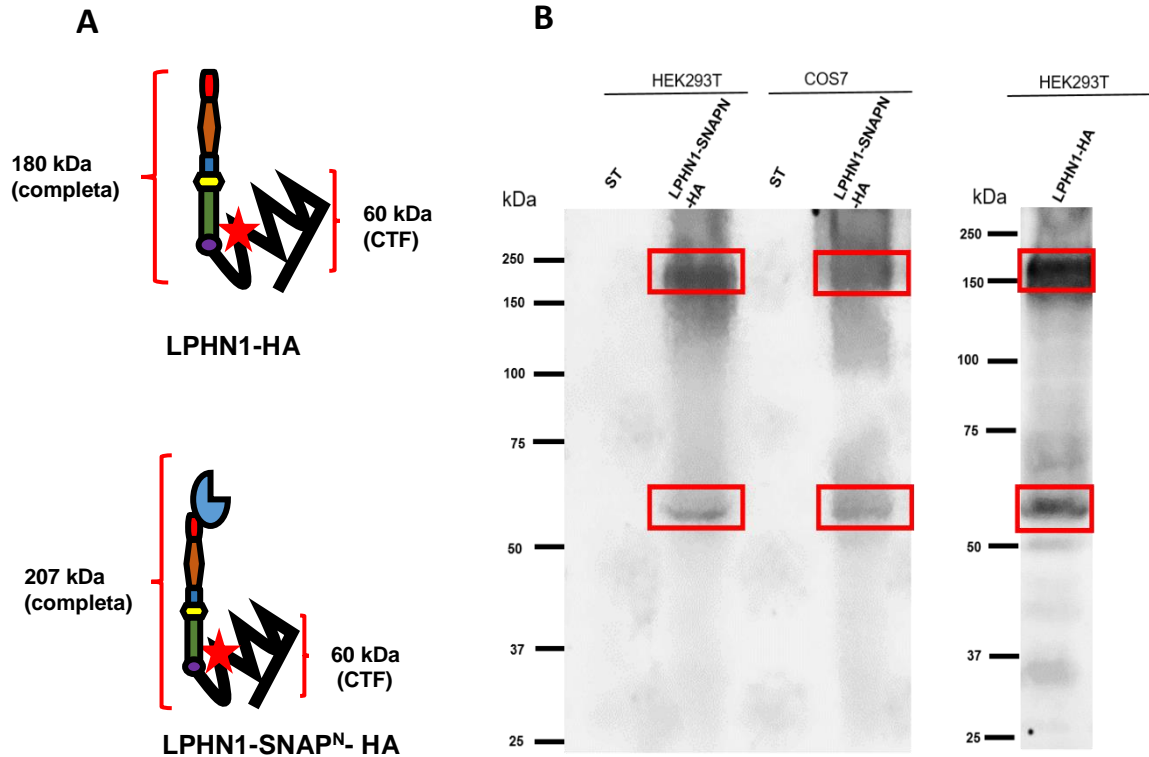


**Figura 17. Secuenciación de la construcción LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA.** El ADN de la construcción LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA fue secuenciado por el método de Sanger en el laboratorio LANBAMA, San Luis Potosí. En el panel de abajo se muestra el alineamiento entre LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA y la secuencia obtenida de la secuenciación (flecha roja). El rectángulo en azul resalta un fragmento de la secuenciación, cuya magnificación se muestra en el panel de arriba.

### 7.3 Expresión de la construcción LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA

Posteriormente, analizamos la expresión de la construcción obtenida por el método de Western Blot de proteínas de membrana. La expresión fue evaluada en las líneas celulares HEK293T y COS7 utilizando un anticuerpo contra la bandera HA ubicado en la primera asa del CTF (Figura 18). En ambas líneas celulares se logró la expresión de LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA con el patrón esperado (Figura 18B). Tanto en el control como en la construcción LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA fue observada dos bandas, una entre 50-75 kDa y la otra entre 150-250 kDa. Las dos bandas son características del receptor debido a su procesamiento proteolítico. La forma cortada corresponde a la banda de ≈60 kDa y la forma no cortada a la de ≈180 kDa (Figura 18A). EL peso de LPHN1-

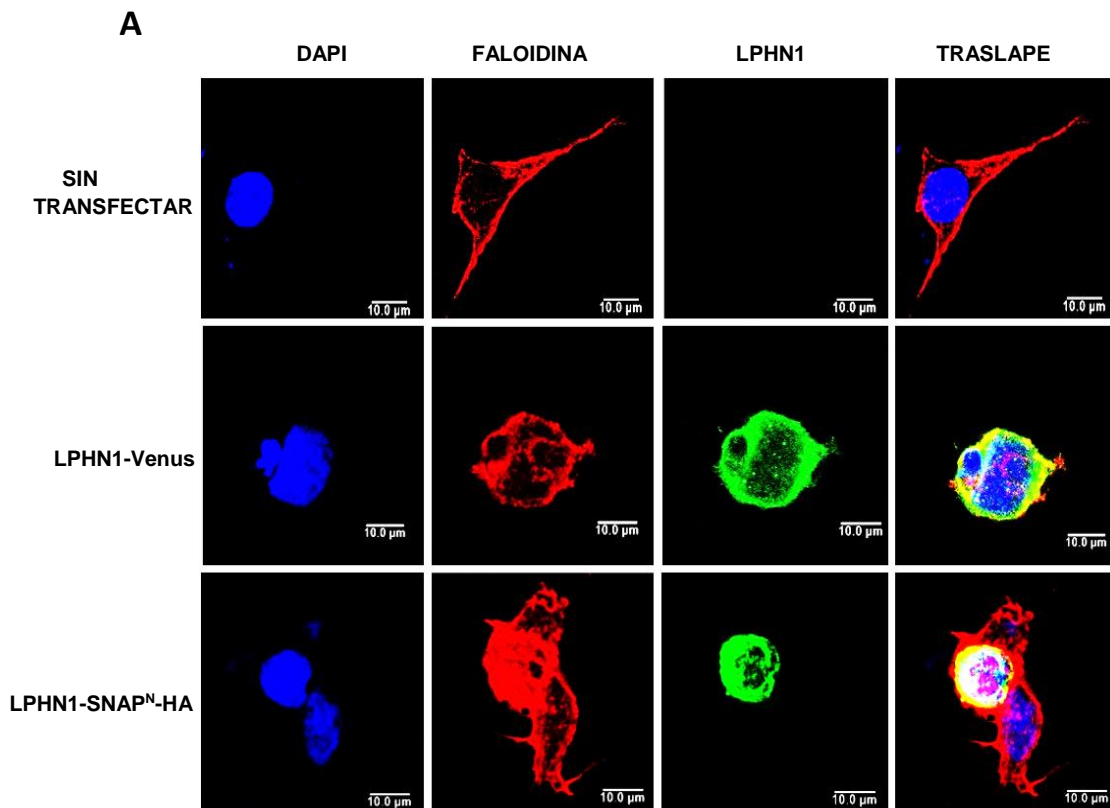
SNAP<sup>N</sup>-HA obtenido tanto en células HEK293T como en COS7, fue de  $\approx 207$  kDa, debido a que el SNAP posee un peso teórico 27 kDa. El control LPHN1-HA fue expresado en las células HEK293T.



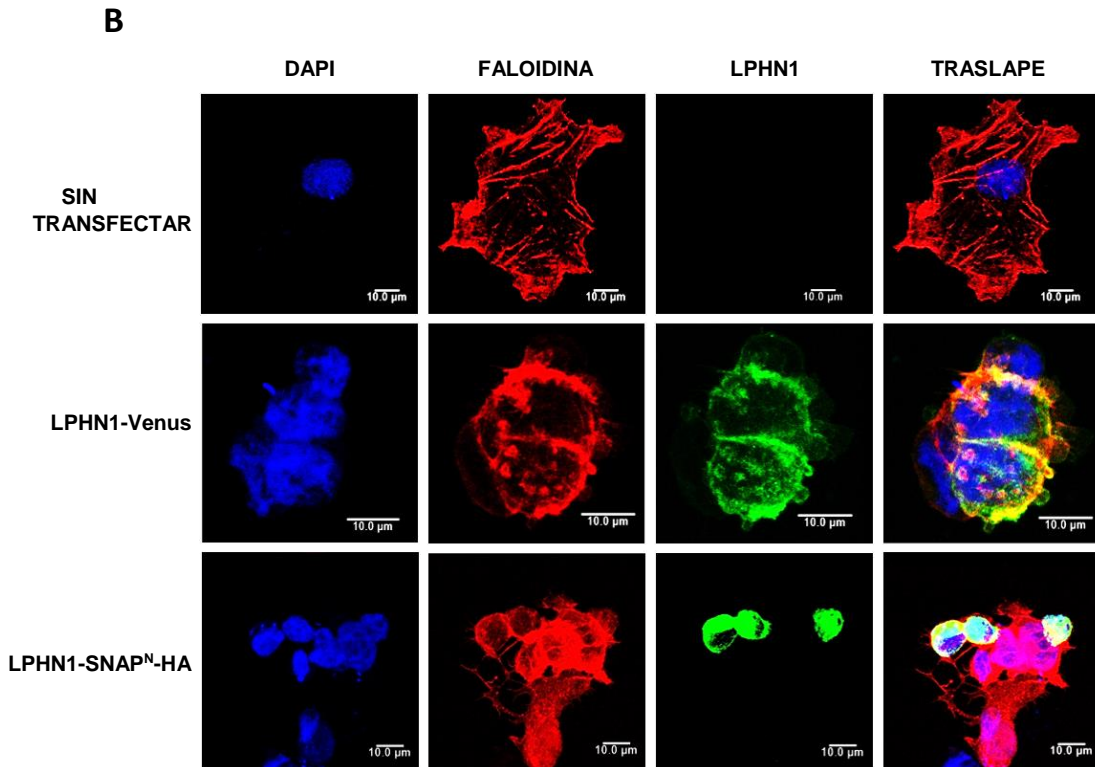
**Figura 18.** Expresión de la construcción LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA en HEK293T y COS7 por Western Blot. **(A)** Esquema que representa las partes de la Latrofilina sin y con el SNAP. La forma no cortada de la construcción LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA tiene un peso de 207 kDa mientras que el peso de LPHN1-HA es de 180 kDa. La estrella roja representa la bandera HA. **(B)** Western Blot para evaluar la expresión de la construcción LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA. Las células CO7 y HEK293 T fueron transfectadas con 4  $\mu$ g del ADN de la construcción LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA. Pasado 48 horas, la expresión de la proteína LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA fue evaluada mediante un inmunoblot contra la bandera HA. Las bandas señaladas en recuadros rojos representan las bandas obtenidas tanto en la construcción como en el control (LPHN1-HA).

Además, también evaluamos la expresión por microscopía confocal en ambas líneas celulares haciendo una inmunotinción contra HA y revelando con un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 633. En este ensayo las células fueron permeabilizadas y utilizamos como control la LPHN1 acoplada a Venus

(LPHN1-Venus). La Figura 19 muestra la expresión tanto de la construcción como la del control en células HEK 293T (Figura 19A) y COS7 (Figura 19B). La expresión de la Latrofilina provocó en las células un cambio morfológico (células redondeadas) en comparación con las células no transfectadas (células alargadas). En ambas construcciones observamos una fuerte colocalización con actina cortical, lo cual nos indica, que la expresión en membrana de la LPHN1 silvestre no es afectada por la presencia del SNAP en su N-terminal.

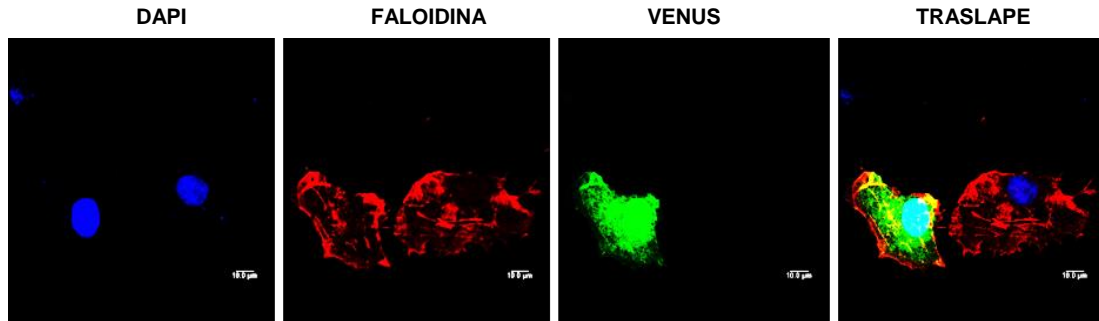


**Figura 19.** (continua en la siguiente página)



**Figura 19.** Expresión de la construcción LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA por microscopía confocal en células HEK293T (A) y células COS7 (B). Las células fueron sembradas en cubreobjetos y transfectadas con 800 ng, de los plásmidos LPHN1-Venus y LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA, por pozo. Luego de 48 horas de transfección fueron fijadas, teñidas y permeabilizadas. Para la detección de la construcción LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA se utilizó un anticuerpo primario contra HA y un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 633 (anti-ratón). Las imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal Leica. La lectura fue hecha a una velocidad de 600 hertz y *between stacks*. El espacio entre líneas escogido fue de 0.4  $\mu\text{m}$ . Por cada preparación fueron tomadas un promedio de 10 fotos. En los paneles se muestra en azul: DAPI; en rojo: faloidina, en verde: LPHN1 y por último el traslape de los canales. n=3, escala:10.0  $\mu\text{m}$ .

Para descartar que esta morfología no es producto de la transfección por PEI, se transfectaron a las células COS con la proteína citoplasmática Venus. Como se puede observar, las células que expresan a Venus poseen una morfología alargada al igual que las células sin transfectar (Figura 20).

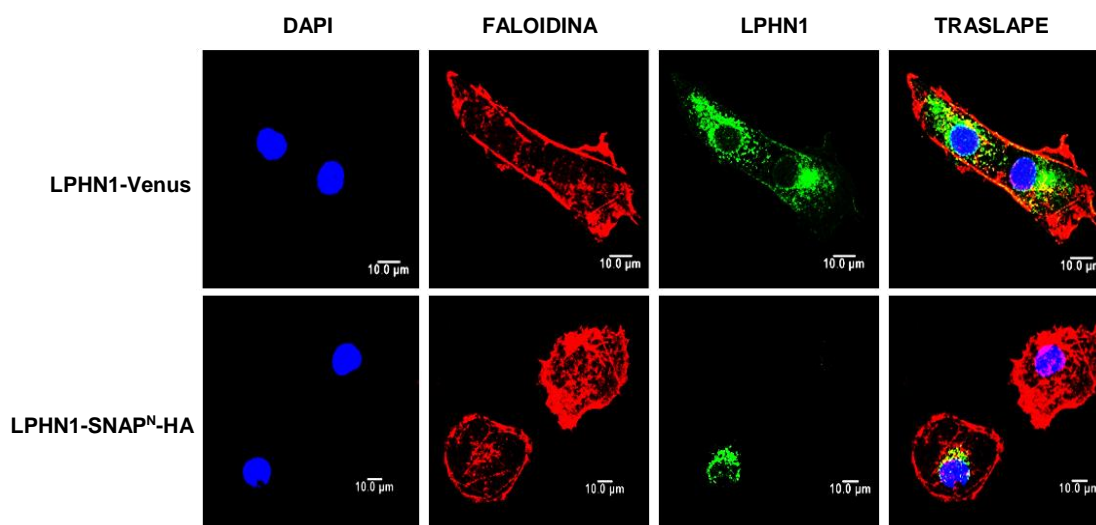


**Figura 20. Células COS7 que expresan a Venus.** Las células fueron sembradas en cubreobjetos y transfectadas con 800 ng, del plásmido Venus, por pozo. Luego de 48 horas de transfección fueron fijadas, teñidas y permeabilizadas. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal Leica. La lectura fue hecha a una velocidad de 600 hertz y *between stacks*. El espacio entre líneas escogido fue de 0.4 μm. Por cada preparación fueron tomadas un promedio de 10 fotos. En los paneles se muestra en azul: DAPI; en rojo: faloidina, en verde: Venus y por último el traslape de los canales. n=3, escala:10.0 μm.

Sin embargo, las células COS7 tienen un procesamiento proteolítico diferente a las HEK293T puesto que encontramos una población considerable de células COS7 con el receptor perinuclear y poco o nulo receptor en membrana. Este resultado es visto tanto en el panel del control como en el de la construcción. Las células con estas características poseen una morfología más parecida al control sin transfectar (Figuras 19 y 21).

No obstante, realizamos tinciones sin permeabilizar para asegurarnos que el receptor se encontraba en membrana (primer y tercer panel de la Figura 23). El receptor LPHN1, marcado con un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 633, se encuentra bordeando toda la superficie celular. Estas tinciones ratificaron la presencia en membrana de LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA.





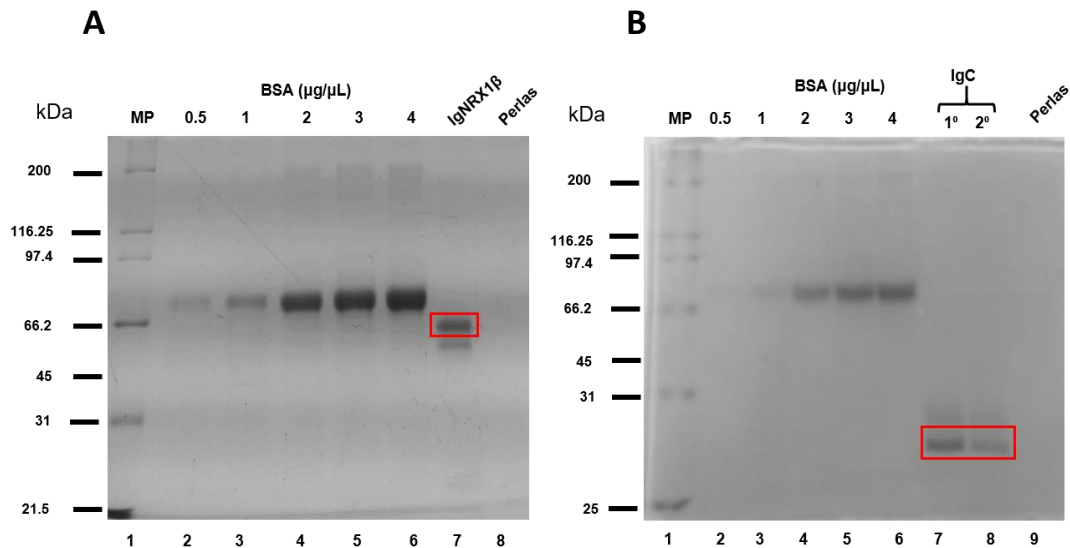
**Figura 21. Localización de la LPHN1 en las células COS7 permeabilizadas.** Las células COS7 fueron sembradas en cubreobjetos y transfectadas con 800 ng, de los plásmidos LPHN1-Venus y LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA, por pozo. Luego de 48 horas de transfección fueron fijadas, teñidas y permeabilizadas. Para la detección de la construcción LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA se utilizó un anticuerpo primario contra HA y un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 633 (anti-ratón). Las imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal Leica. La lectura fue hecha a una velocidad de 600 hertz y *between stacks*. El espacio entre líneas escogido fue de 0.4  $\mu\text{m}$ . Por cada preparación fueron tomadas un promedio de 10 fotos. En los paneles se muestra en azul: DAPI; en rojo: faloidina, en verde: LPHN1 y por último el traslape de los canales. n=3, escala:10.0  $\mu\text{m}$ .

#### 7.4 Producción de ligandos sintéticos (Fc-IgG)

En esta etapa fueron producidos los ligandos necesarios para los ensayos posteriores de marcaje de superficie celular e internalización. Para ello, utilizamos el método de transfección por fosfato de calcio y la línea celular HEK293. Este protocolo fue estandarizado anteriormente por el laboratorio.

La Figura 22 muestra el resultado de la purificación de los ligandos IgNRX1 $\beta$  (Figura 22A) e IgC (Figura 22B). El peso teórico de la IgNRX1 $\beta$  (-SS4) es de 54.68 kDa y el de IgC de 26.05 kDa. Para el ligando IgNRX1 $\beta$  obtuvimos dos bandas correspondientes entre 45 y 66.2 kDa. La banda más intensa fue tomada para la cuantificación de la concentración de IgNRX1 $\beta$ . Igualmente, para IgC se obtuvieron dos bandas entre 25 y 31 kDa; y fue tomada para la cuantificación la banda más intensa tanto para el 1<sup>o</sup> como para el 2<sup>o</sup> eluido.

Las densidades de las bandas de las diferentes concentraciones de BSA, fueron medidas a través del programa Image Studio v5.2. Con los datos de densitometría fue realizado una curva de densidad vs concentración, en el programa Excel. La pendiente de esta curva fue utilizada para calcular la concentración de las proteínas IgNRX1 $\beta$  y IgC.



**Figura 22. Purificación de ligandos sintéticos IgNRX1 $\beta$  (A) e IgC (B).** Placas Petri de 10 cm fueron sembradas con células HEK293 por 24 horas. Posteriormente fueron transfectadas con 20  $\mu$ g de ADN de los plásmidos que contienen las secuencias de los ligandos sintéticos, IgNRX1 $\beta$  e IgC. Pasada 96 horas de transfección las proteínas fueron purificadas. Para la cuantificación de los ligandos sintéticos se corrió un gel de poliacrilamida con diferentes concentraciones de BSA (0,5; 1; 2; 3; 4  $\mu$ g/  $\mu$ L) (carriles del 2-6). Los ligandos purificados son señalados en recuadros rojos (carriles 7 para IgNRX 1 $\beta$ ; 7 y 8 para IgC). El carril 8 en A corresponde al 20% de las perlas utilizadas para la purificación de IgNRX1 $\beta$ . El carril 9 en B corresponde al 20% de las perlas utilizadas para la purificación de IgC. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular (MP). Con las concentraciones de BSA fue realizada una curva en el programa Excel. La pendiente de esta curva fue utilizada para la cuantificación de los ligandos sintéticos.

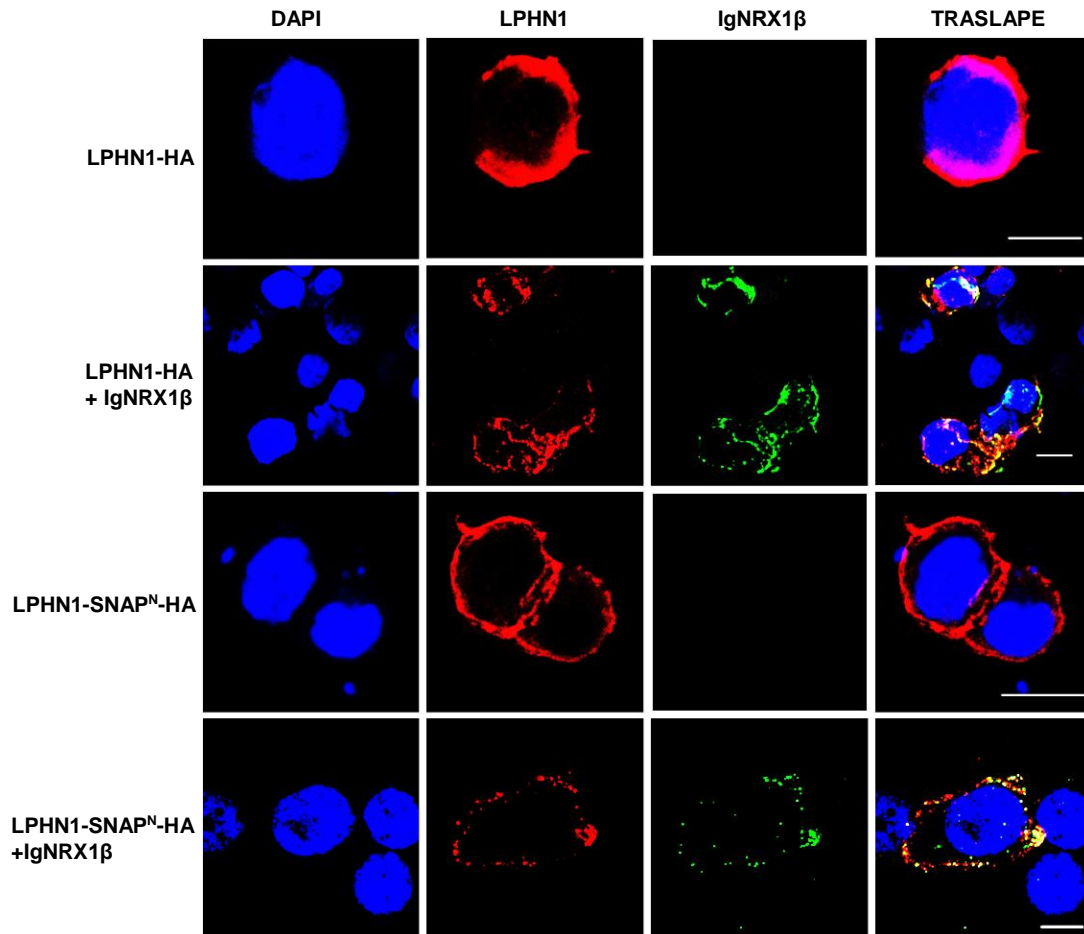
En un volumen de 100  $\mu$ L fue obtenido una concentración de IgNRX1 $\beta$  de 1.57  $\mu$ g/ $\mu$ L [28.7  $\mu$ M]. Para IgC fueron realizados dos eluidos. En el primer eluido obtuvimos 4.67  $\mu$ g/ $\mu$ L [1.8  $\mu$ M] de concentración y el segundo obtuvimos una concentración de 2.52  $\mu$ g/ $\mu$ L [1  $\mu$ M].

Como control también fueron cargados en ambos geles el 20% de las perlas utilizadas. En el carril de las perlas no encontramos ninguna banda correspondiente a proteínas.

### **7.5 Ensayo de marcaje de superficie celular**

En el ensayo de marcaje de superficie celular utilizamos la línea celular COS7. Las células COS7 fueron incubadas por 16 horas a 8°C con la IgNRX1 $\beta$ . Las características del ensayo son descritas en el acápite de materiales y métodos. El receptor fue detectado por la presencia de la bandera HA en su CTF y el ligando con un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488 contra la secuencia de IgG humana unida al ligando. El ensayo fue realizado sin permeabilizar las células.

Como apreciamos en la Figura 23, la LPHN se encuentra en membrana celular y la neurexina está presente mayoritariamente donde está la LPHN. Además, las células que no expresan a la LPHN1 no presentan marcaje para la neurexina 1 $\beta$ . Este resultado se observa mejor en el traslape de las Figuras, tanto para la construcción control como para la construcción problema. Por lo tanto, la neurexina producida (IgNRX1 $\beta$ ) es capaz de interaccionar con la LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA de manera similar al control LPHN1-HA.



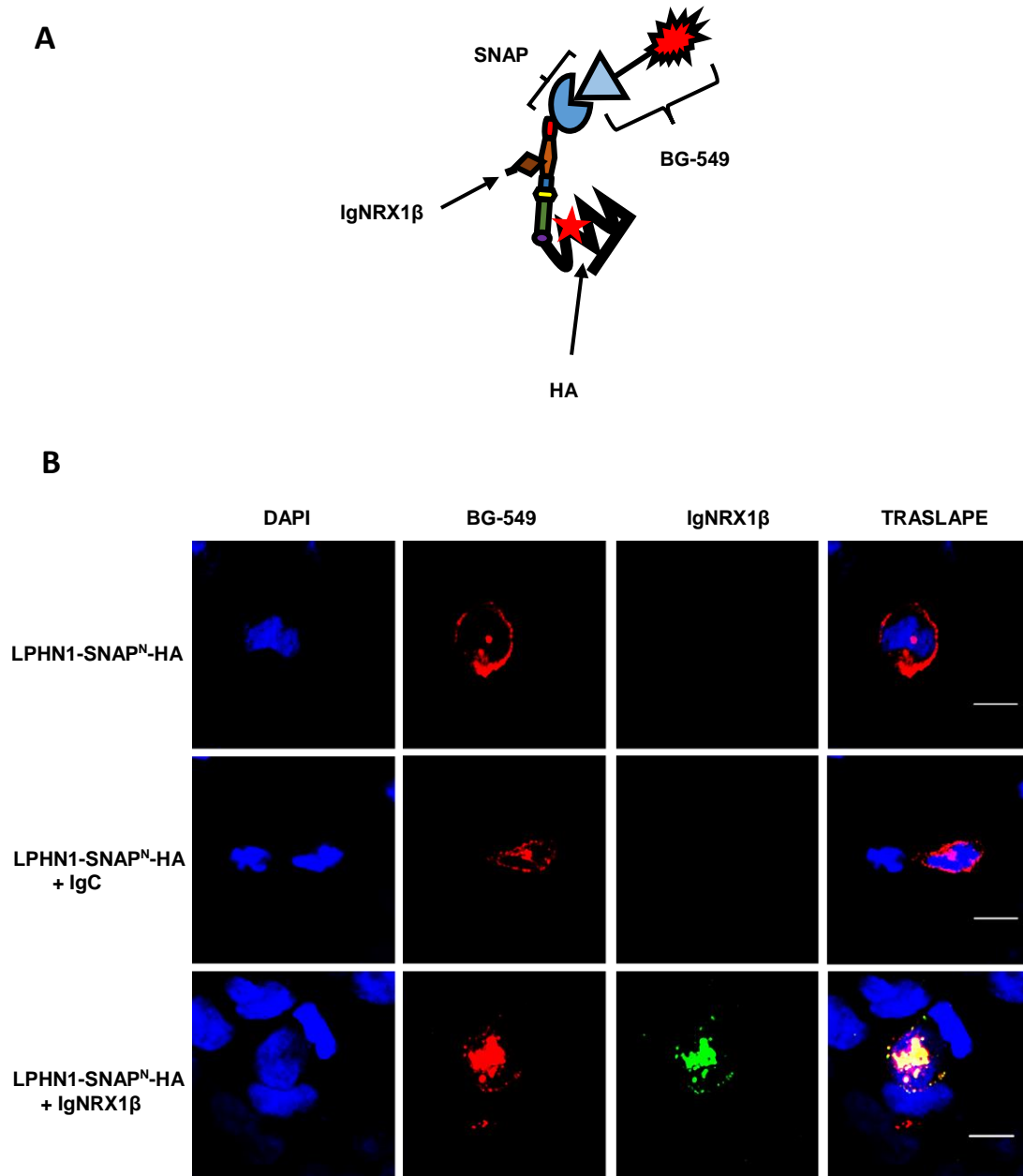
**Figura 23. Marcaje de superficie celular en células COS7.** Las células COS7 fueron sembradas en cubreobjetos y transfectadas con 800 ng, de los plásmidos LPHN1-HA y LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA, por pozo. Luego de 48 horas de transfección fueron incubadas por 16 horas a 8°C con una solución que contenía al ligando, IgNRX1β. Pasado este tiempo las células fueron fijadas y teñidas. Las células no fueron permeabilizadas. Para la detección de las construcciones LPHN1-HA y LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA se utilizó un anticuerpo primario contra HA y un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 633 (anti-ratón). Para la detección de IgNRX1β se utilizó un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488 (anti-humano). Se utilizó como control células transfectadas con LPHN1-HA y LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA no incubadas con el ligando IgNRX1β. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal Leica. La lectura fue hecha a una velocidad de 600 hertz y *between stacks*. El espacio entre líneas escogido fue de 0.4 μm. Por cada preparación fueron tomadas un promedio de 10 fotos. La Figura muestra el corte del medio de cada foto (corte único). En los paneles se muestra en azul: DAPI; en rojo: LPHN1, en verde: IgNRX1β y por último el traslape de los canales. n=2, escala:10.0 μm.

## 7.6 Ensayo de internalización

En los ensayos de internalización fue utilizada la línea celular HEK293T, porque en comparación con las COS7 fue delimitado, mejor la población del receptor LPHN1 en membrana. En este ensayo fueron incubadas las células transfectadas con la LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA, por 2 horas a 37°C, con el ligando IgNRX1 $\beta$  o IgC. A 37°C podremos observar la respuesta del receptor LPHN1, en ausencia o presencia de su ligando endógeno, producto de la maquinaria celular. Además, marcamos el NTF del receptor con un fluoróforo acoplado al sustrato del SNAP (BG-549). Este sustrato no es permeable a las células y se conoce comercialmente como SNAP Surface<sup>TM</sup> 549.

La Figura 24 muestra un grupo de paneles representativos de tres experimentos independientes para este ensayo. Las células que expresan a la LPHN1, luego de 2 horas de incubación sin presencia de ligando, contienen una gran población de receptores en membrana plasmática. Sin embargo, también se aprecia un grupo de receptores en el interior celular (grupo rojo en el interior celular). Cuando estas células son incubadas con un ligando no específico (IgC) el comportamiento es muy similar a las células sin ligando. El color verde no fue visualizado en ninguna de las condiciones mencionadas anteriormente.

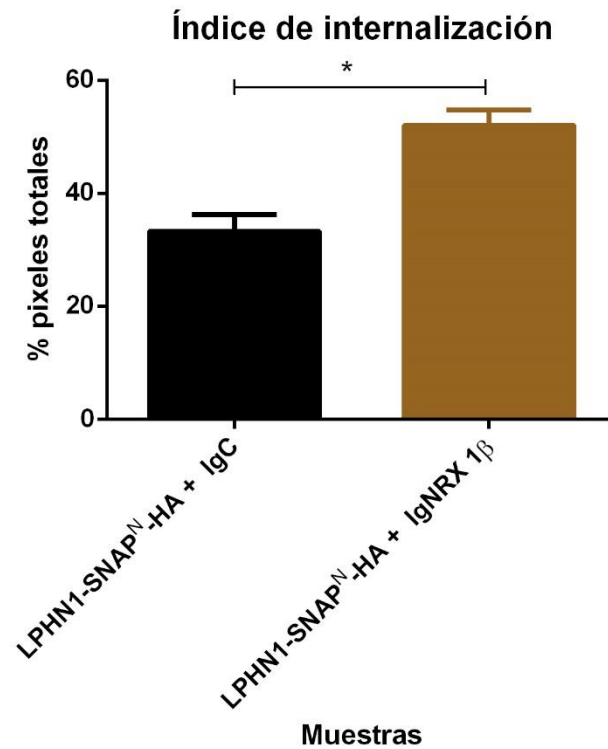
En las células transfectadas con LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA e incubadas con su ligando endógeno IgNRX1 $\beta$ , observamos una mayor internalización celular del receptor (LPHN1). Además, el receptor internalizado presenta una fuerte colocalización intracelular con la IgNRX1 $\beta$  (grupo amarillo en el interior celular).



**Figura 24.** Ensayo de internalización de la LPHN1 en células HEK293T. (A) Esquema que representa las diferentes banderas de la LPHN1, así como el sustrato del SNAP y la neurexina1β. (B) Internalización del receptor LPHN1 en células HEK293T. Las células fueron sembradas en placas de 35 cm y transfectadas con 4 µg, del plásmido LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA. Luego de 24 horas de transfección fueron sembradas en cubreobjetos presentes en placas de 24 pozos por 24 horas. Pasado este tiempo se incubaron a las células con el sustrato del SNAP por 30 min. Rápidamente las células fueron lavadas e incubadas con una solución que contiene al ligando, IgNRX1β o IgC, por 2 horas (90 min) a 37°C

protegido de la luz. Posteriormente las células fueron fijadas, teñidas y permeabilizadas. Para la detección de la construcción LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA se utilizó el sustrato BG- 549. Para la detección de IgNRX1 $\beta$  se utilizó un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488 (anti-humano). Como control fue utilizado células transfectadas con LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA, no incubadas con el ligando IgNRX1 $\beta$ ; así como células incubadas con IgC. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal Leica. La lectura fue hecha a una velocidad de 600 hertz y *between stacks*. El espacio entre líneas escogido fue de 0.4  $\mu$ m. Por cada preparación fueron tomadas un promedio de 10 fotos. La Figura muestra el corte intermedio de cada foto (corte único). En los paneles se muestra en azul: DAPI; en rojo: LPHN1 marcada con BG-549, en verde: IgNRX1 $\beta$  y por último el traslape de los canales. n=3, escala:10.0  $\mu$ m.

La figura 25 muestra la relación de pixeles intracelulares vs pixeles totales de las células incubadas con IgNRX1 $\beta$  y las incubadas con IgC (control). Un total de 20 células individuales fueron analizadas para IgC mientras que 28 células individuales para IgNRX1 $\beta$ . El índice de internalización en presencia de IgC fue de 33.3% y en presencia de IgNRX1 $\beta$  de un 52%. La mayor cantidad de receptor intracelular fue obtenida, en las células incubadas 2 horas con IgNRX1 $\beta$  en comparación con el control, con diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ) (Figura 25).



**Figura 25. Índice de internalización.** De las proyecciones máximas tomadas de cada condición, LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA + IgC y LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA + IgNRX1β, fueron analizados el número de pixeles totales y el número de pixeles intracelulares. Con la relación de los pixeles expresadas en por ciento fue calculado el índice de internalización del receptor LPHN1 (número de pixeles intracelulares/ número de pixeles totales x 100). Las gráficas indican las medias ± SEM de tres experimentos independientes. El análisis estadístico fue realizado mediante la prueba de *t*, (\*P ≤ 0.05).



## 8. Discusión

Las LPHNs pertenecen al grupo de los aGPCRs. Este receptor posee tres isoformas siendo la isoforma 1 la más estudiada (Meza-Aguilar and Boucard, 2014), sin embargo, muy poco se conoce de su señalización y regulación celular. Por lo tanto, con este trabajo pretendemos indagar en uno de los mecanismos de regulación presente en el grupo de los GPCRs, la desensibilización.

La desensibilización es un proceso llevado a cabo por las células, que permite la regulación de la señalización del receptor. Esta puede ser como producto de una regulación negativa o por la acción conjunta de cinasas y proteínas adaptadoras presente en las células. La desensibilización homóloga es el mecanismo mejor caracterizado en los GPCRs y es conocida también como desensibilización por agonista. En este proceso tienen un papel fundamental el par GRK- $\beta$ -arrestina. Como resultado de la desensibilización homóloga los receptores pueden ser internalizados para su degradación o reciclamiento en membrana (Hilger, 2018, Ferguson et al., 1998, Luttrell and Lefkowitz, 2002). Varios autores informan la internalización de GPCRs clásicos, producto del proceso de desensibilización. Como por ejemplo el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico, el receptor de angiotensina II de tipo 1A y el receptor de histamina H<sub>3</sub> humano. Los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos son uno de los GPCRs mejor caracterizados y pertenecen al grupo de los receptores similares a Rodopsina. La internalización o secuestro del  $\beta_2$ -adrenoreceptor es incrementada cuando las  $\beta$ -arrestinas 1 y 2 son sobreexpresadas. Sin embargo, este fenómeno de internalización del  $\beta_2$ -adrenoreceptor se ve abolido en presencia de mutantes de  $\beta$ -arrestinas defectuosos para el secuestro (Ferguson et al., 1996). Similar proceso de internalización ocurre para el receptor de angiotensina II tipo 1A. A diferencia del receptor de angiotensina II tipo 1A, la endocitosis de los  $\beta_2$ -adrenoreceptores es dependiente de vesículas recubiertas por clatrina (Zhang et al., 1996). En el receptor de histamina H<sub>3</sub> humano, la isoforma larga (445 aminoácidos) y la isoforma corta (365 aminoácidos) presentan

desensibilización homóloga en presencia de su agonista RAMH. En ambas isoformas es observado una pérdida de señalización inicial por Gai y una disminución del receptor en membrana celular (Garcia-Galvez et al., 2018).

Hasta la fecha poco se conoce de la desensibilización en los GPCRs de Adhesión. Por lo tanto, se nos hace interesante conocer: qué tipo de desensibilización poseen los GPCRs de adhesión como la LPHN. En aras de direccionalizar el trabajo, nosotros planteamos la siguiente hipótesis: "La internalización del GPCR de adhesión LPHN1, es producto de la interacción con su ligando endógeno neurexina 1 $\beta$ ".

En este trabajo se propone utilizar la línea celular COS7 por ser células de gran tamaño (diámetro 40 y 60  $\mu$ m) y poseer un amplio citoplasma (ver Figura 19B). Esta característica nos permitirá observar más detallado el proceso de internalización del receptor. Sin embargo, esta línea celular no se había trabajado en el laboratorio y se desconocía la eficiencia de transfección en las células COS7, para la LPHN, por el método de PEI. Por ello evaluamos su eficiencia de transfección por citometría de flujo a diferentes tiempos, 24 y 48 horas. Como se aprecia en el acápite de resultados se obtuvo una mayor eficiencia de transfección a las 48 horas. La misma fue de aproximadamente un 30% de transfección con un alto porcentaje de viabilidad celular ( $\approx$ 95%). Este resultado es similar a lo obtenido en la literatura para la línea celular COS7 a las 48 de transfección. El polímero catiónico Polietilenimina (ramificado, PM: 25 kDa) posee una eficiencia de transfección de  $\approx$ 30% en células COS7 (Yang et al., 2016). Los datos obtenidos nos permitieron ratificar: 1) que las células COS7 pueden ser transfectadas por este método de transfección (Wang et al., 2012, Duan et al., 2012) y 2) el tiempo en el cual obtenemos mayor expresión del receptor LPHN1.

La línea celular HEK293T posee una eficiencia de transfección mayor del 60% por el método de PEI (Cruz, 2017).

Las proteínas transmembranales, durante su síntesis y maduración pasan por diferentes compartimentos celulares; al igual que cuando son endocitadas para su reciclamiento en membrana o degradación (Hirschberg et al., 1998).

En el estudio de la internalización de un receptor, requerimos analizar aquellos receptores endocitados producto de la estimulación con su ligando. Sin embargo, si la bandera que marca al receptor no es la correcta no podremos delimitar la población deseada. Además, en el receptor LPHN puede ser endocitado diferencialmente el segmento N-terminal del C-terminal (Volynski et al., 2004). Es por ello que nosotros generamos la construcción LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA. Esta construcción tiene como característica fundamental una bandera en el NTF y la otra en el CTF. En el NTF se encuentra el SNAP, la cual, es un enzima que interacciona covalentemente con su sustrato (BG). El sustrato está unido a una sonda sintética, que nos permitirá visualizar solo la LPHN1 internalizada. Mientras que en la primera asa transmembranal del CTF se encuentra la bandera HA (ver Figura 18A).

La tecnología del SNAP es ampliamente utilizada en el marcaje de diversos receptores. Entre ellos se encuentran: el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Bosch et al., 2014), los receptores de quimiocinas como CXCR4 y CXCR7 (Levoye et al., 2015), los receptores del ácido  $\gamma$  amino butírico (GABAR) (Maurel et al., 2008); así como al receptor  $\beta_2$ -adrenérgico (Cole and Donaldson, 2012). Sin embargo, esta técnica no se había utilizado en el estudio de los GPCRs de adhesión. En todos estos trabajos la presencia del SNAP en el N-terminal no impidió su correcta expresión en membrana. Este resultado concuerda con la expresión obtenida de la construcción LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA, mediante la técnica de Western Blot en ambas líneas celulares.

Cuando analizamos la expresión por microscopia confocal, observamos que la construcción se expresa en membrana plasmática similar a su control LPHN1-Venus en ambas líneas celulares. Las células que expresan a la LPHN1 son más redondas y pequeñas que las células control. Este resultado ya había sido informado en la tesis de maestría de Cruz, 2017 para la línea celular HEK293T. En este trabajo ella concluye que la sobreexpresión de las LPHNs causa redondeamiento de las células HEK293T, con una disminución en su dimensión. Además, que este redondeamiento celular pudiera ser

producto de una interacción con el citoesqueleto de actina directa e indirectamente.

Interesantemente, para la línea celular COS7 es observado un cambio morfológico cuando se sobreexpresa la LPHN1. Estas células al igual que las HEK293T cambian de un fenotipo alargado (ST) a un fenotipo redondeado con ganancia de volumen celular (ver Figura 19B). Aunque pareciera que se reproduce el mismo patrón que en la línea HEK293T, mayores evidencias son necesarias para asumir una conclusión adecuada. No obstante a esto, es conocido que en las células que expresan a la LPHN pueden coexistir ambas morfologías, extendida (similar a las células ST) o redondeadas (Volynski et al., 2004). En ambas líneas celulares el cambio morfológico observado no es producto del método de transfección utilizado (ver Figura 20) (Cruz, 2017).

Se han descrito para la LPHN1 diferentes ligandos endógenos. Entre ellos están las neurexinas, teneurinas y FLRT (Meza-Aguilar and Boucard, 2014). En este trabajo se purificó como proteína recombinante, la neurexina 1 $\beta$  acoplada a la fracción constante de la IgG humana. Esta construcción modifica al ligando transmembranal en una proteína soluble, la cual, nos permitió una evaluación más detallada y fina de la interacción ligando-receptor. La afinidad de ambas proteínas es informada por Boucard y colaboradores, 2012. Realizando estudios de unión (*binding assays*) con diferentes isoformas de la neurexina demostraron que la LPHN1 tiene una afinidad de unión en cantidades nanomolares hacia la neurexina 1 $\beta$  sin el sitio de *splicing 4* (Kd  $\approx 48,6 \pm 8.6$  nM). Conociendo este valor de afinidad nosotros utilizamos concentraciones saturantes de neurexina 1 $\beta$  (200 nM) con el objetivo de ocupar la mayoría de las LPHNs expresadas en la membrana plasmática.

El dominio de olfactomedina de la LPHN es el encargado de interactuar con el dominio LNS de la neurexina 1 $\beta$  (Boucard et al., 2012), por lo que cabe la posibilidad que el SNAP afecte la interacción con esta. Bien sea por bloqueo del sitio de unión o por cambios estructurales que anulen la interacción con el ligando. En los ensayos de marcaje de superficie celular se demuestra una clara interacción entre LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA e IgNRX1 $\beta$ . La neurexina 1 $\beta$  solo

es capaz de interactuar con aquellas células que expresan al receptor en membrana, por lo que la presencia del SNAP en el N-terminal no afecta la unión a su ligando.

Extrapolando estos resultados, la herramienta LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA pudiera servir para estudiar la internalización de la LPHN1 con otros ligandos, como las neurexinas  $\alpha$  y FLRT3. Estas proteínas interactúan con la LPHN1 por el dominio de olfactomedina al igual que la neurexina  $1\beta$ . En el caso de las teneurinas que interactúan con la LPHN1 por el dominio de lectina (Li et al., 2018) desconocemos si el SNAP puede ser un impedimento para la interacción ligando-receptor. Debido a que no conocemos la estructura tridimensional que adquiere este dominio al estar acoplado con el SNAP y si se vería imposibilitada a interactuar con las teneurinas. Nosotros decidimos poner el SNAP en el extremo N-terminal del NTF porque en el laboratorio se habían evaluado exitosamente otras construcciones con estas mismas características; tal es el caso de la LPHN1-LN-SF GFP<sub>11</sub>-HA (Avila, 2015).

También creamos la construcción LPHN1-SNAP<sup>LO</sup>-HA con el objetivo de evaluar cuál de las dos herramientas era la mejor a utilizar. En esta pusimos la bandera del SNAP entre el dominio de lectina y olfactomedina de la LPHN1. Sin embargo, a pesar que obtuvimos el ADN deseado de la construcción, no pudimos observar una expresión celular de la misma por Western Blot o incluso por microscopía confocal. Por lo que no avanzamos en el análisis con esta construcción.

El siguiente paso a evaluar es la funcionalidad de la construcción generada. Es decir, si esta herramienta nos permite estudiar la internalización del receptor. Para ello empleamos la línea celular HEK293T y no las células COS7. Aunque en un principio pensamos emplear a las COS7 como un mejor modelo para estudiar la internalización celular por el tamaño de su citosol, el cambio morfológico producto de la sobreexpresión de la LPHN, redujo su citosol. Además, a los 30 min de incubar a las células (expresan a la LPHN1) con el sustrato del SNAP, observamos que existe una gran proporción de receptor internalizado en comparación con las HEK293T en las cuales no se

observó este grupo intracelular. Este resultado es muy interesante ya que nos sugiere que el receptor, en esta línea celular, pudiera comportarse de manera basal diferente a las HEK293T. Sin embargo, no profundizamos en ello y decidimos emplear a las HEK293T para continuar el estudio. Asimismo, la línea celular empleada en nuestro antecedente más cercano fue la HEK293T. Un ejemplo directo de que el mecanismo de desensibilización puede ocurrir en los aGPCRs es lo informado para el GPR56. En este estudio se demuestra que la delección del fragmento N-terminal ( $\Delta$ NTGPR56) en este receptor aumenta su actividad constitutiva y por lo tanto la citotoxicidad en las células HEK293. Al co-transfectar  $\Delta$ NTGPR56 con  $\beta$ 2-arrestina aumenta la internalización del receptor, rescatando la viabilidad celular. Por lo que podemos concluir que el proceso de internalización regula la actividad constitutiva del receptor (Paavola et al., 2011). Si bien este resultado no se adecúa al concepto de desensibilización homóloga, no es incorrecto. En los últimos 20 años se ha descubierto que los receptores con actividad constitutiva presentan también una marcada desensibilización e internalización celular. Tal es el caso del PTH1Rc (GPCR del grupo de la Secretinas), en el cual la sobreexpresión de la  $\beta$ -arrestina 2 inhibe la acumulación constitutiva de AMPc (Ferrari and Bisello, 2001). Así como también, el receptor  $\alpha_{1D}$ -AR, el cual sin presencia de ligando presenta una co-localización intracelular con arrestina 2 en compartimentos que también contienen al receptor de la transferrina (McCune et al., 2000).

Si es verdad que la internalización no es desensibilización, la desensibilización si puede conducir a la internalización. El proceso de internalización no solo es importante para el cese de la señalización de los GPCRs sino también para la re sensibilización y la *downregulation* (Luttrell and Lefkowitz, 2002); así como la señalización intracelular (Wang et al., 2018).

En las células que expresan a la LPHN1, sin la presencia del ligando y luego de dos horas, fue observado internalización del receptor. Resultado comparable cuando se incubó con un ligando no específico para este receptor, IgC. La ubicación del receptor en el interior celular puede ser producto de una

regulación basal de las células HEK293T (ver Figura 24). Recientemente, fue observado actividad constitutiva por G $\alpha$ i para las isoformas 1 y 3 de la Latrofilina (Li et al., 2018). Por lo que pudiera explicar por qué obtenemos internalización del receptor en ausencia de la estimulación con ligando.

Como antecedente directo de este trabajo, Boucard y colaboradores en el 2012 observaron que las células que expresan a la LPHN1 son capaces de endocitar a la neurexina 1 $\beta$ , mostrando mayor cantidad de neurexina intracelular a las 2 horas. Por tal motivo, nosotros escogimos este tiempo para realizar nuestros ensayos de internalización. La neurexina por sí sola no puede atravesar la membrana celular y el hecho de encontrarla en el interior celular nos indica una internalización producto de la interacción con la LPHN1.

Luego de 2 horas de incubación con la IgNRX1 $\beta$  se ve una co-localización en membrana plasmática entre ambas proteínas. Hay una mayor acumulación de LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA en el interior celular en comparación con las células sin ligando y tratadas con IgC. Además, este grupo intracelular posee una fuerte co-localización con la IgNRX1 $\beta$  (ver Figura 24). A nivel poblacional, existe un mayor índice de internalización del receptor LPHN1 en las células incubadas con su ligando endógeno IgNRX1 $\beta$  (ver Figura 25). Por lo tanto, la neurexina potencia la internalización de la LPHN1. Este resultado nos indica que la LPHN, al menos, posee una desensibilización por agonista. Desde el punto de vista del conocimiento nos aporta nuevas evidencias para entender diferentes procesos en los que participa la LPHN1. Como por ejemplo la regulación o terminación de la función de la LPHN1 en la estabilización de la sinapsis neuronal.

## 9. Conclusiones

1. El mayor porcentaje de transfección para las células COS7 se observó a las 48 horas.
2. Se obtuvo la construcción LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA. Su patrón de expresión fue el esperado para las dos líneas celulares.
3. LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA se expresa en membrana plasmática.
4. Se detectó la interacción entre las células que expresan la LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA y el ligando NRX1 $\beta$ .
5. Con la herramienta LPHN1-SNAP<sup>N</sup>-HA pudimos detectar internalización celular de la LPHN1 producto de la interacción con su ligando endógeno, IgNRX1 $\beta$ .



## 10. Perspectivas

1. Evaluar las propiedades de internalización de la LPHN1 con diferentes ligandos.
2. Analizar la cinética temporal de internalización de LPHN1.
3. Identificar si el dominio NTF y el CTF se endocitan en los mismos compartimentos.
4. Identificar si hay una posible interacción de la LPHN1 con  $\beta$ -arrestina.
5. Investigar cual  $\beta$ -arrestina participa en el mecanismo de internalización.
6. Evaluar si la internalización es mediada por clatrina.
7. Identificar a los determinantes moleculares de la internalización en el receptor LPHN1.

## 11. Literatura citada

- ARAC, D., BOUCARD, A. A., BOLLIGER, M. F., NGUYEN, J., SOLTIS, S. M., SUDHOF, T. C. & BRUNGER, A. T. 2012. A novel evolutionarily conserved domain of cell-adhesion GPCRs mediates autoproteolysis. *EMBO J*, 31, 1364-78.
- AUST, G., ZHU, D., VAN MEIR, E. G. & XU, L. 2016. Adhesion GPCRs in Tumorigenesis. *Handb Exp Pharmacol*, 234, 369-396.
- AVILA, M. 2015. "Estudio de la interacción latrofilina-ligando y su función en la adhesión celular, aplicando una nueva herramienta denominada CLynView". MAESTRA EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE BIOLOGÍA CELULAR, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional UNIDAD ZACATENCO.
- BJARNADOTTIR, T. K., FREDRIKSSON, R., HOGLUND, P. J., GLORIAM, D. E., LAGERSTROM, M. C. & SCHIOTH, H. B. 2004. The human and mouse repertoire of the adhesion family of G-protein-coupled receptors. *Genomics*, 84, 23-33.
- BOSCH, P. J., CORREA, I. R., JR., SONNTAG, M. H., IBACH, J., BRUNSVELD, L., KANGER, J. S. & SUBRAMANIAM, V. 2014. Evaluation of fluorophores to label SNAP-tag fused proteins for multicolor single-molecule tracking microscopy in live cells. *Biophys J*, 107, 803-14.
- BOSCH, P. J., CORRÊA, J. I. R., SONNTAG, M. H., IBACH, J., BRUNSVELD, L., KANGER, J. S. & SUBRAMANIAM, V. 2014 Evaluation of Fluorophores to Label SNAP-Tag Fused Proteins for Multicolor Single-Molecule Tracking Microscopy in Live Cells. *Biophysical Journal*, 107 803–814.
- BOUCARD, A. A., KO, J. & SUDHOF, T. C. 2012. High affinity neurexin binding to cell adhesion G-protein-coupled receptor C1RL1/latrophilin-1 produces an intercellular adhesion complex. *J Biol Chem*, 287, 9399-413.
- BOUCARD, A. A., MAXEINER, S. & SUDHOF, T. C. 2014. Latrophilins function as heterophilic cell-adhesion molecules by binding to teneurins: regulation by alternative splicing. *J Biol Chem*, 289, 387-402.
- CALEBIRO, D., NIKOLAEV, V. O., PERSANI, L. & LOHSE, M. J. 2010. Signaling by internalized G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 31, 221-8.
- COLE, N. B. & DONALDSON, J. G. 2012. Releasable SNAP-tag probes for studying endocytosis and recycling. *ACS Chem Biol*, 7, 464-9.
- CRUZ, J. 2017. "Evaluación de los Cambios morfológicos y en el citoesqueleto de actina inducidos por los GPCR de adhesión Latrofilina en células HEK293T". MAESTRA EN CIENCIAS, CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, UNIDAD ZACATENCO.
- DUAN, S. Y., GE, X. M., LU, N., WU, F., YUAN, W. & JIN, T. 2012. Synthetic polyspermine imidazole-4, 5-amide as an efficient and cytotoxicity-free gene delivery system. *Int J Nanomedicine*, 7, 3813-22.
- FERGUSON, S. S., DOWNEY, W. E., 3RD, COLAPIETRO, A. M., BARAK, L. S., MENARD, L. & CARON, M. G. 1996. Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science*, 271, 363-6.
- FERGUSON, S. S., ZHANG, J., BARAK, L. S. & CARON, M. G. 1998. Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor desensitization and resensitization. *Life Sci*, 62, 1561-5.

- FERRARI, S. & BISELLO, A. 2001. Cellular Distribution of Constitutively Active Mutant Parathyroid Hormone (PTH)/PTH-Related Protein Receptors and Regulation of Cyclic Adenosine 3',5' -Monophosphate Signaling by  $\beta$ -Arrestin2. *Molecular Endocrinology* 15 149–163.
- FREDRIKSSON, R., LAGERSTROM, M. C., LUNDIN, L. G. & SCHIOTH, H. B. 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.
- GARCIA-GALVEZ, A. M., ESCAMILLA-SANCHEZ, J., FLORES-MALDONADO, C., CONTRERAS, R. G., ARIAS, J. M. & ARIAS-MONTANO, J. A. 2018. Differential homologous desensitization of the human histamine H3 receptors of 445 and 365 amino acids expressed in CHO-K1 cells. *Neurochem Int*, 112, 114-123.
- GAUTIER, A., JUILLERAT, A., HEINIS, C., CORREA, I. R., JR., KINDERMANN, M., BEAUFILS, F. & JOHNSON, K. 2008. An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells. *Chem Biol*, 15, 128-36.
- HARMAR, A. J. 2001. Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome Biol*, 2, Reviews3013.
- HILGER, D., MASUREEL, M., KOBILKA, B. K. 2018. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat Struct Mol Biol*, 25, 4-12.
- HIRSCHBERG, K., MILLER, C. M., ELLENBERG, J., PRESLEY, J. F., SIGGIA, E. D., PHAIR, R. D. & LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. 1998. Kinetic analysis of secretory protein traffic and characterization of golgi to plasma membrane transport intermediates in living cells. *J Cell Biol*, 143, 1485-503.
- KEPPLER, A., GENDREIZIG, S., GRONEMEYER, T., PICK, H., VOGEL, H. & JOHNSON, K. 2003. A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nat Biotechnol*, 21, 86-9.
- KEPPLER, A., PICK, H., ARRIVOLI, C., VOGEL, H. & JOHNSON, K. 2004. Labeling of fusion proteins with synthetic fluorophores in live cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 9955-9.
- LANGENHAN, T., AUST, G. & HAMANN, J. 2013. Sticky signaling--adhesion class G protein-coupled receptors take the stage. *Sci Signal*, 6, re3.
- LANGENHAN, T. & SCHONEBERG, T. (eds.) 2016. *Adhesion G Protein-coupled Receptors Molecular, Physiological and Pharmacological Principles in Health and Disease*: Springer Nature.
- LELIANOVA, V. G., DAVLETOV, B. A., STERLING, A., RAHMAN, M. A., GRISHIN, E. V., TOTTY, N. F. & USHKARYOV, Y. A. 1997. Alpha-latrotoxin receptor, latrophilin, is a novel member of the secretin family of G protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, 272, 21504-8.
- LEVOYE, A., ZWIER, J. M., JARACZ-ROS, A., KLIPFEL, L., COTTET, M., MAUREL, D., BDIQUI, S., BALABANIAN, K., PRÉZEAU, L., TRINQUET, E., DURROUX, T. & BACHELERIE, F. 2015. A Broad G Protein-Coupled Receptor Internalization Assay that Combines SNAP-Tag Labeling, Diffusion-Enhanced Resonance Energy Transfer, and a Highly Emissive Terbium Cryptate. *Frontiers in Endocrinology*, 6.
- LI, J., SHALEV-BENAMI, M., SANDO, R., JIANG, X., KIBROM, A., WANG, J., LEON, K., KATANSKI, C., NAZARKO, O., LU, Y. C., SUDHOF, T. C., SKINIOTIS, G. & ARAC, D. 2018. Structural Basis for Teneurin Function in Circuit-Wiring: A Toxin Motif at the Synapse. *Cell*, 173, 735-748.e15.
- LITTLE, K. D., HEMLER, M. E. & STIPP, C. S. 2004. Dynamic Regulation of a GPCR-Tetraspanin-G Protein Complex on Intact Cells: Central Role of CD81 in Facilitating GPR56-G $\alpha$ (q/11) Association. *Mol Biol Cell*, 15, 2375-87.

- LUTTRELL, L. M. & LEFKOWITZ, R. J. 2002. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci*, 115, 455-65.
- MAUREL, D., COMPS-AGRAR, L., BROCK, C., RIVES, M. L., BOURRIER, E., AYOUB, M. A., BAZIN, H., TINEL, N., DURROUX, T., PREZEAU, L., TRINQUET, E. & PIN, J. P. 2008. Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization. *Nat Methods*, 5, 561-7.
- MCCUNE, D. F., EDELMANN, S. E., OLGES, J. R., POST, G. R., WALDROP, B. A., WAUGH, D. J., PEREZ, D. M. & PIASCNIK, M. T. 2000. Regulation of the cellular localization and signaling properties of the alpha(1B)- and alpha(1D)-adrenoceptors by agonists and inverse agonists. *Mol Pharmacol*, 57, 659-66.
- MEZA-AGUILAR, D. G. & BOUCARD, A. A. 2014. Latrophilins updated. *Biomol Concepts*, 5, 457-78.
- PAAVOLA, K. J., STEPHENSON, J. R., RITTER, S. L., ALTER, S. P. & HALL, R. A. 2011. The N terminus of the adhesion G protein-coupled receptor GPR56 controls receptor signaling activity. *J Biol Chem*, 286, 28914-21.
- PIERCE, K. L., PREMONT, R. T. & LEFKOWITZ, R. J. 2002. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 639-50.
- SCHIOTH, H. B. & FREDRIKSSON, R. 2005. The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen Comp Endocrinol*, 142, 94-101.
- SILVA, J. P. & USHKARYOV, Y. A. 2010. The latrophilins, "split-personality" receptors. *Adv Exp Med Biol*, 706, 59-75.
- SUDHOF, T. C. 2017. Synaptic Neurexin Complexes: A Molecular Code for the Logic of Neural Circuits. *Cell*, 171, 745-769.
- SUGITA, S., ICHTCHENKO, K., KHVOTCHEV, M. & SUDHOF, T. C. 1998. alpha-Latrotoxin receptor C1RL/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, 32715-24.
- VOLYNSKI, K. E., SILVA, J. P., LELIANOVA, V. G., ATIQR RAHMAN, M., HOPKINS, C. & USHKARYOV, Y. A. 2004. Latrophilin fragments behave as independent proteins that associate and signal on binding of LTX(N4C). *Embo j*, 23, 4423-33.
- WANG, W., QIAO, Y. & LI, Z. 2018. New Insights into Modes of GPCR Activation. *Trends Pharmacol Sci*, 39, 367-386.
- WANG, Y. Q., SU, J., WU, F., LU, P., YUAN, L. F., YUAN, W. E., SHENG, J. & JIN, T. 2012. Biscarbamate cross-linked polyethylenimine derivative with low molecular weight, low cytotoxicity, and high efficiency for gene delivery. *Int J Nanomedicine*, 7, 693-704.
- YANG, S., SHI, H., CHU, X., ZHOU, X. & SUN, P. 2016. A rapid and efficient polyethylenimine-based transfection method to prepare lentiviral or retroviral vectors: useful for making iPS cells and transduction of primary cells. *Biotechnol Lett*, 38, 1631-41.
- ZHANG, J., FERGUSON, S. S., BARAK, L. S., MENARD, L. & CARON, M. G. 1996. Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem*, 271, 18302-5.