



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**“Estudio de la función patofisiológica relacionada con cáncer del
dominio GAIN de Lphn3 en células HEK293”**

T E S I S

Que presenta

M. en C. Monserrat Avila Zozaya

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOLOGÍA CELULAR

Director de tesis

Dr. Antony Boucard Jr.

El presente trabajo de tesis se desarrolló en el laboratorio #54 del departamento de biología celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav) bajo la dirección del Dr. Antony Boucard Jr.

La autora hace patente su agradecimiento al Centro Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado a través de la beca #295903 que le fue otorgada para la realización de sus estudios de doctorado en ciencias con especialidad en biología celular.

Agradecimientos

Toda mi gratitud, al Cinvestav por otorgar con excelencia las condiciones de infraestructura, enseñanza académica y apoyos económicos que permiten la formación de investigadores y generación de conocimiento científico para nuestro país.

Agradezco infinitamente a mi mentor el Dr. Antony Boucard Jr., por todas sus enseñanzas, paciencia, compromiso y profesionalismo que mostro durante mi formación académica.

A los integrantes de mi comité tutorial: Dr. José Eduardo Pérez Salazar, Dr. Francisco García Sierra, Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes y Dr. Jesús Adolfo García Sáinz, por su disponibilidad y compromiso en el asesoramiento de este trabajo de investigación.

Para mis hermanos del destino, gracias por sus palabras de aliento y apoyo incondicional.

Por todo su amor, apoyo, comprensión y valores enseñados quiero agradecer y dedicar este trabajo de investigación a mi amada familia.

“Lo que conocemos es una gota, lo que no conocemos es un océano”

Isaac Newton

Índice

Lista de tablas	1
Lista de figuras.....	2
Abreviaturas.....	3
Resumen.....	5
Abstract.....	6
1. Introducción	7
1.1. Receptores acoplados a proteínas G.....	7
1.2. Aspectos generales de los receptores de adhesión acoplados a proteínas G.....	9
1.3. GAIN: Un dominio conservado entre los aGPCRs.....	12
1.4. Modelos de activación de los aGPCRs	14
1.5. Latrofilinas.....	17
1.6. Latrofilina 3	18
1.6.1. Ligandos endógenos de Lphn3	21
1.7. Generalidades del cáncer	24
1.7.1. Adhesión celular y cáncer.....	25
1.7.2. Participación de los GPCRs en cáncer.....	27
2. Justificación	29
3. Hipótesis	29
4. Objetivos.....	29
4.1. Objetivo general.....	29
4.2. Objetivos específicos	29
5. Métodos	30
5.1. Plásmidos de expresión.....	30
5.2. Cultivo celular.....	30
5.3. Transfecciones transitorias.....	30
5.4. Ensayo de agregación celular.....	31
5.5. Producción y purificación de Flrt3 ^{ECD} -Fc	31
5.6. Ensayo de marcaje de superficie celular	32
5.7. Western blot.....	32
5.8. Detección de la expresión del receptor en la superficie celular (DECS)	33
5.9. Ensayos de transferencia de energía de resonancia bioluminiscente (BRET)	33

5.10. Inmunocitoquímica	34
5.11. Ensayos de cierre de herida.....	35
5.12. Ensayos de motilidad celular 2D por microscopia de “time-lapse”	35
5.13. Análisis de imágenes.....	36
5.14. Análisis estadístico.....	37
6. Resultados	37
6.1. Caracterización de los efectos de las variantes K ⁵⁶¹ N, A ⁷⁶⁰ G, D ⁷⁹⁸ H, S ⁸¹⁰ L y E ⁸¹¹ Q en la formación de complejos de adhesión entre Lphn3 y sus ligandos Teneurina 2 y Flrt3 ..	37
6.2. Las mutaciones en el dominio GAIN relacionadas con cáncer no alteraron la eficiencia de autoproteólisis del GPS ni la expresión de Lphn3 en la membrana	41
6.3. La señalización a través de la activación de la proteína Gα13 inducida por el estado constitutivo de Lphn3, es disminuida por la presencia de las mutaciones relacionadas con cáncer en el dominio GAIN	43
6.4. La inhibición de la formación de lamelipodios inducida por Lphn3 es alterada en células que expresaron a la variante S ⁸¹⁰ L relacionada con cáncer.....	46
6.5. La expresión de Lphn3 modifica la remodelación del citoesqueleto de vimentina promoviendo cambios en la forma nuclear, los cuales son atenuados por la presencia de las mutaciones S ⁸¹⁰ L y E ⁸¹¹ Q.....	49
6.6. La presencia de Lphn3 o sus variantes asociadas a cáncer retardaron la migración celular polarizada	53
6.7. La mutante S ⁸¹⁰ L del dominio GAIN asociada a cáncer inhibe la motilidad celular inducida por Lphn3	56
7. Discusión.....	60
7.1. Análisis de las mutaciones de Lphn3 asociadas a cáncer en el modelado del dominio GAIN	60
7.2. Relación de la función de Lphn3 y sus variantes en un contexto de cáncer	61
8. Conclusiones	64
9. Perspectivas.....	65
10. Apéndices.....	66
10.1. Imágenes suplementarias	66
10. 2. Materiales.....	67
10.2.1. Cepa bacteriana.....	67
10.2.2. Medios de cultivo.....	67
10.2.3. Antibióticos.....	68
10.2.4. Enzimas.....	68
10.2.5. Kits comerciales.....	68

10.2.6. Reactivos.....	69
10.2.7. Soluciones y amortiguadores no comerciales	69
11. Referencias.....	71

Lista de tablas

Tabla 1. Medios de cultivo empleados para el crecimiento de bacterias DH5 α	67
Tabla 2. Medio DMEM utilizado para el cultivo de rutina de células HEK293	68
Tabla 3. Concentración de antibióticos usados para la selección de bacterias transformadas	68
Tabla 4. Enzimas usadas en las diferentes metodologías.....	68
Tabla 6. Reactivos empleados en este estudio	69
Tabla 7. Soluciones no comerciales	69

Lista de figuras

Figura 1. Estructura general 3D del complejo GPCR-proteínas G.	8
Figura 2. Clasificación y nomenclatura de los aGPCRs.	11
Figura 3. Estructura general de los aGPCRs.	12
Figura 4. Estructura del dominio GAIN de Lphn1/ADGRL1.....	13
Figura 5. Modelo de la reacción de autoproteólisis en el GPS de Lphn1/ADGRL1.	14
Figura 6. Modelos de activación propuestos para los aGPCRs.	15
Figura 7. Estructuras de GPR56/ADGRG1 y Lphn3/ADGRL3 acoplados a proteínas G.	17
Figura 8. Estructura de las Lphns 1-3	18
Figura 9. Estructura de la región extracelular de teneurina 2.....	22
Figura 10. Representación de la interacción transcelular entre Lphn3 y Flrt3.	24
Figura 11. Representación esquemática de la organización de los dominios de Lphn3.	39
Figura 12. Las mutaciones en el dominio GAIN de Lphn3 relacionadas con cáncer, alteraron diferencialmente la adhesión intercelular con sus ligandos Flrt3 y Teneurina 2.	40
Figura 13. Las mutaciones en el dominio GAIN no impiden la unión de Lphn3 con Flrt3....	41
Figura 14. La expresión y autoproteólisis de Lphn3 no son alteradas por la presencia de las mutaciones en el dominio GAIN asociadas a cáncer.	42
Figura 16. Estrategia de clonación para la fusión de mVenus a las variantes de Lphn3.	47
Figura 17. La mutación S ⁸¹⁰ L altera la remodelación del citoesqueleto de actina inducido por Lphn3.	48
Figura 18. La remodelación de vimentina inducida por Lphn3 coincide con deformaciones nucleares que fueron disminuidas por las mutaciones S ⁸¹⁰ L y E ⁸¹¹ Q.....	51
Figura 19. La reorganización del citoesqueleto de vimentina coincidió con las deformaciones nucleares en células que expresaron Lphn3.	52
Figura 20. El efecto retardado de la migración polarizada inducido por Lphn3 no fue alterado por las mutaciones del dominio GAIN relacionadas con cáncer.	55
Figura 21. La motilidad celular inducida por la expresión de Lphn3 fue inhibida por la mutación S ⁸¹⁰ L presente en el dominio GAIN.	58
Figura S1. Flrt3 se unió únicamente a células que expresaron Lphn3 o sus variantes	66
Figura S2. Purificación de Flrt3 ^{ECD} -Fc	67

Abreviaturas

A: Alanina

ADGRs: Adhesion G protein-coupled receptors

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANOVA: Analysis of variance

ATCC: American Type Culture Collection

BSA: Bovine serum albumin

CTF: C terminal fragment

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

ECD: Extracelular domain

EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein

EGTA: Ethylene Glycol Tetraacetic Acid

F: Fenilalanina

Fig.: Figura

H: Histidina

HEK293: Human embryonic kidney 293 cells

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HormR: Hormone region

HRP: Horseradish Peroxidase

L: Leucina

M: Metionina

NTF: N terminal fragment

PBS: Phosphate buffered saline

PDZ: PSD95, DlgA, ZO-1

PEI: Polyethylenimine

PFA: Paraformaldehyde

RLuc8: Renilla-luciferin 8

S: Serina

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SFB: Suero fetal bovino

T: Treonina

TBST: Tris-buffered saline

TM: Transmembrane

TMB: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

V: Valina

Resumen

La latrofilina 3 (Lphn3/ADGRL3) es un receptor acoplado a proteínas G de adhesión (aGPCR) que participa en procesos de adhesión a través del establecimiento de interacciones proteína-proteína, y en procesos de señalización a través de su acople a proteínas G. Lphn3 se expresa predominantemente en sistema nervioso central, sin embargo su expresión también ha sido detectada en otros tejidos. El gen que codifica para Lphn3 ha sido blanco de mutaciones relacionadas con enfermedades como el cáncer. En un estudio de secuenciación masiva de muestras de tumores primarios de humano, se identificaron mutaciones somáticas para Lphn3. La mayoría de estas mutaciones estuvieron localizadas en la región codificante para el dominio GAIN, que es el dominio de identidad de los aGPCRs. El dominio GAIN es la región más conservada entre los aGPCRS por lo que su función es un elemento crucial para entender la fisiología de Lphn3. Hasta ahora, no está claro cómo las mutaciones identificadas en muestras de tumores de cáncer de pulmón en el dominio GAIN afectan la función de Lphn3. Por lo tanto, en este trabajo estudiamos las alteraciones celulares y moleculares de estas variantes como una herramienta para revelar funciones desconocidas del dominio GAIN. Lo que descubrimos fue que las mutaciones redujeron la adhesión entre Lphn3 con su ligando endógeno Flrt3, así como también la señalización a través del acople a $G\alpha_{13}$. Además, modificaron la remodelación del citoesqueleto de actina y de vimentina, y de manera interesante, las propiedades motiles inducidas por Lphn3 silvestre se inhibieron cuando se expresó la mutación S⁸¹⁰L. Estos datos colocan al dominio GAIN de Lphn3 como un regulador importante en la motilidad celular dependiente de Lphn3, ampliando así nuestra comprensión de los eventos celulares y moleculares en los cuales este dominio podría estar involucrado.

Abstract

Latrophilin 3 (Lphn3/ADGRL3) is an adhesion G protein-coupled receptor (aGPCR) that participates in adhesion processes through the establishment of protein-protein interactions, and in signaling processes through its coupling to G proteins. Lphn3 is predominantly expressed in the central nervous system; however, its expression has also been detected in other tissues. The gene encoding Lphn3 has been targeted by mutations related to diseases such as cancer. In a massive sequencing study of human primary tumor samples, somatic mutations for Lphn3 were identified. Most of these mutations were harbored in the coding region for the GAIN domain, which is the signature domain of the aGPCRs. The GAIN domain is the most conserved region among the aGPCRs so its function is a crucial element in understanding the physiology of Lphn3. So far, it is not clear how mutations identified in lung cancer tumor samples in the GAIN domain affect Lphn3 function. Therefore in this work we studied the cellular and molecular alterations of these variants as a tool to reveal unknown functions of the GAIN domain. What we found was that the mutations reduced the adhesion between Lphn3 with its endogenous ligand Flrt3, as well as signaling through coupling to $G\alpha_{13}$. They also modified actin cytoskeleton and vimentin remodeling and interestingly, the motile properties induced by wild-type Lphn3 were inhibited when the S⁸¹⁰L mutation was expressed. These data situate the GAIN domain of Lphn3 as an important regulator in Lphn3-dependent cell motility thus broadening our understanding of the cellular and molecular events in which this domain might be involved.

1. Introducción

1.1. Receptores acoplados a proteínas G

Los receptores acoplados a proteínas G o GPCRs representan la familia más grande de proteínas de membrana con alrededor de 800 miembros identificados hasta ahora en el ser humano [7]. Son receptores muy dinámicos y versátiles que regulan una gran diversidad de procesos en condiciones normales y patológicas, al ser activados por un gran repertorio de ligandos extracelulares que van desde hormonas, iones, fotones, odorantes, neurotransmisores, aminoácidos, entre muchos otros más [4, 5]. Con base a la similitud en sus secuencias, características estructurales y funcionales, los GPCRs han sido clasificados en diferentes familias; la clasificación más actual organiza a los GPCRs en seis familias principales: Rodopsina, Sabor tipo 2 (amargo), Frizzled, Glutamato, Secretina y Adhesión, de las cuales, la familia Rodopsina es la más grande en tamaño con cerca de 719 integrantes [6]. Todos los GPCRs comparten una arquitectura estructural similar que se basa en siete α -hélices que atraviesan a la membrana plasmática y que están conectadas por tres asas extracelulares y tres intracelulares, de tal modo que el extremo amino y carboxilo terminal se localizan en el espacio extracelular e intracelular respectivamente [7] (Fig. 1).

Los GPCRs pueden señalar a través de tres familias de proteínas: la familia de proteínas G heterotriméricas, cinasas de GPCRs (GRKs) y arrestinas; sin embargo, es a través de su acople a la familia de proteínas G que los GPCRs llevan a cabo la mayoría de sus funciones [8]. La familia de proteínas G heterotriméricas son un complejo de tres isoformas: α , β y γ que se encuentra anclado a la membrana; en su estado inactivo la subunidad α que es una GTPasa se encuentra asociada a GDP, mientras que en un estado activo se induce el intercambio de GDP por GTP promoviendo la separación de la subunidad $G\alpha$ del dímero $G\beta\gamma$ [9]. En humanos existen 16 genes que codifican para más de 21 isotipos de proteínas $G\alpha$, las cuales de acuerdo a la homología en sus secuencias han sido clasificadas en cuatro familias principales: *Gas*, *Gai/o*, *Gaq/11* y *G α 12/13*. Las proteínas $G\alpha$ en su forma activa tienen diferentes blancos efectores, por ejemplo: *Gas* y *Gai/o* actúan sobre la adenilato ciclasa para promover o inhibir la síntesis de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) respectivamente; *Gaq/11* activa a la fosfolipasa C para producir diacilglicerol e inositoltrifosfato, a través de la hidrólisis de fosfatidilinositol bifosfato, y *G α 12/13* actúan

sobre las familias de las Rho GTPasas para modular procesos relacionados con la remodelación del citoesqueleto de actina. Por su parte, las subunidades $G\beta\gamma$ pueden regular la actividad de canales de potasio, de calcio dependientes de voltaje, adenilato ciclasas, fosfolipasa C y MAP cinasas [10, 11].

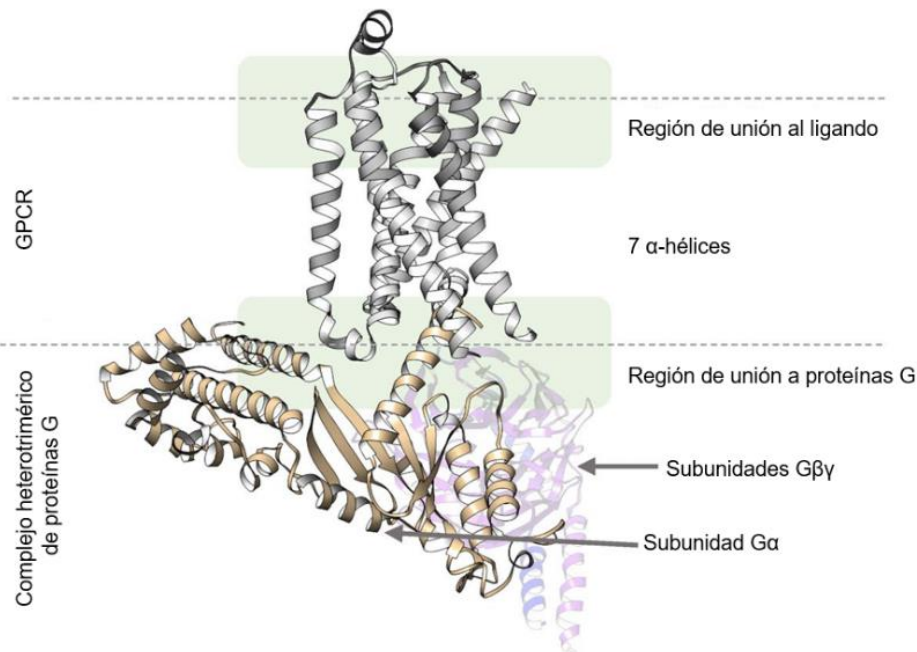


Figura 1. Estructura general 3D del complejo GPCR-proteínas G. Imagen obtenida de [12].

Entonces, ¿cómo es que los GPCRs transducen las señales del medio extracelular a través del complejo heterotrimérico de proteínas G?, pues bien, en la activación canónica de estos receptores la unión de un ligando a su región extracelular va a desencadenar cambios conformacionales en su estructura que inducen vías de señalización intracelulares que llevarán a una respuesta celular. Con base a la estructura cristalina de algunos receptores β adrenérgicos, se ha observado que la característica estructural más común de la activación de los GPCRs implica un movimiento hacia afuera de la sexta hélice transmembranal que expone un compartimento intracelular que encaja con la estructura de las proteínas G, generando una interface de interacción entre la hélice $\alpha 5$ de la proteína G y los pases transmembranales 3, 5 y 6, así como las asas intracelulares 2 y 3 del receptor.

En este punto el receptor activado, va a catalizar una serie de mecanismos que llevarán a la activación de la proteína $G\alpha$ favoreciendo su disociación del dímero $G\beta\gamma$ para actuar sobre sus efectores río abajo. El ciclo de activación del complejo heterotrimérico de proteínas G es terminado, cuando la subunidad $G\alpha$ hidroliza GTP a GDP debido a su actividad intrínseca de GTPasa y su posterior reasociación con el dímero $G\beta\gamma$ [8, 13].

1.2. Aspectos generales de los receptores de adhesión acoplados a proteínas G

Los receptores de adhesión acoplados a proteínas G (aGPCRs/ADGRs), son una familia de proteínas de membrana de gran tamaño que poseen una región amino terminal muy larga implicada en interacciones célula-célula y célula-matriz. Estos receptores se expresan en una gran variedad de especies de vertebrados e invertebrados, y en el ser humano se han identificado 33 aGPCRs que de acuerdo a las similitudes en su secuencia de las siete regiones transmembranales (7TM) han sido categorizados en nueve subfamilias (I-IX) [14] (Fig. 2).

La región amino terminal (NTF) de los aGPCRs contiene diferentes dominios de tipo adhesión involucrados en el establecimiento de interacciones proteína-proteína. Adicionalmente el NTF tiene un dominio firma llamado dominio de inducción de autoproteólisis de GPCR o también conocido como GAIN por sus siglas en inglés. En este dominio se lleva a cabo un proceso de autoproteólisis que separa al receptor en dos fragmentos: un fragmento NTF y un fragmento carboxilo terminal (CTF), que se mantienen unidos por uniones no covalentes hasta su transporte a la membrana [15, 16] (Fig.3).

La región CTF se compone de una región extracelular corta (conocida como secuencia Stachel), 7TM, tres asas intracelulares y tres asas extracelulares (Fig.3). Similar a otros GPCRs, el CTF de los aGPCR tiene propiedades para señalar a través de su acople a proteínas G y también puede interactuar con β arrestinas [17, 18].

Los aGPCRs se expresan en diferentes tejidos y están involucrados en una gran diversidad de procesos como la hemostasia, desarrollo embrionario, angiogénesis, homeostasis de la glucosa, formación de contactos sinápticos, mielinización entre muchos otros más [19-23]. Desde una perspectiva patológica, los aGPCRs están vinculados con el desarrollo de

enfermedades como por ejemplo desordenes del sistema nervioso, síndrome de Usher, angioedema por vibración y cáncer. A pesar de su amplia importancia fisiológica en procesos normales y patológicos, hasta ahora no se han aprobado fármacos que estén dirigidos para alguno de los aGPCRs [24-26].

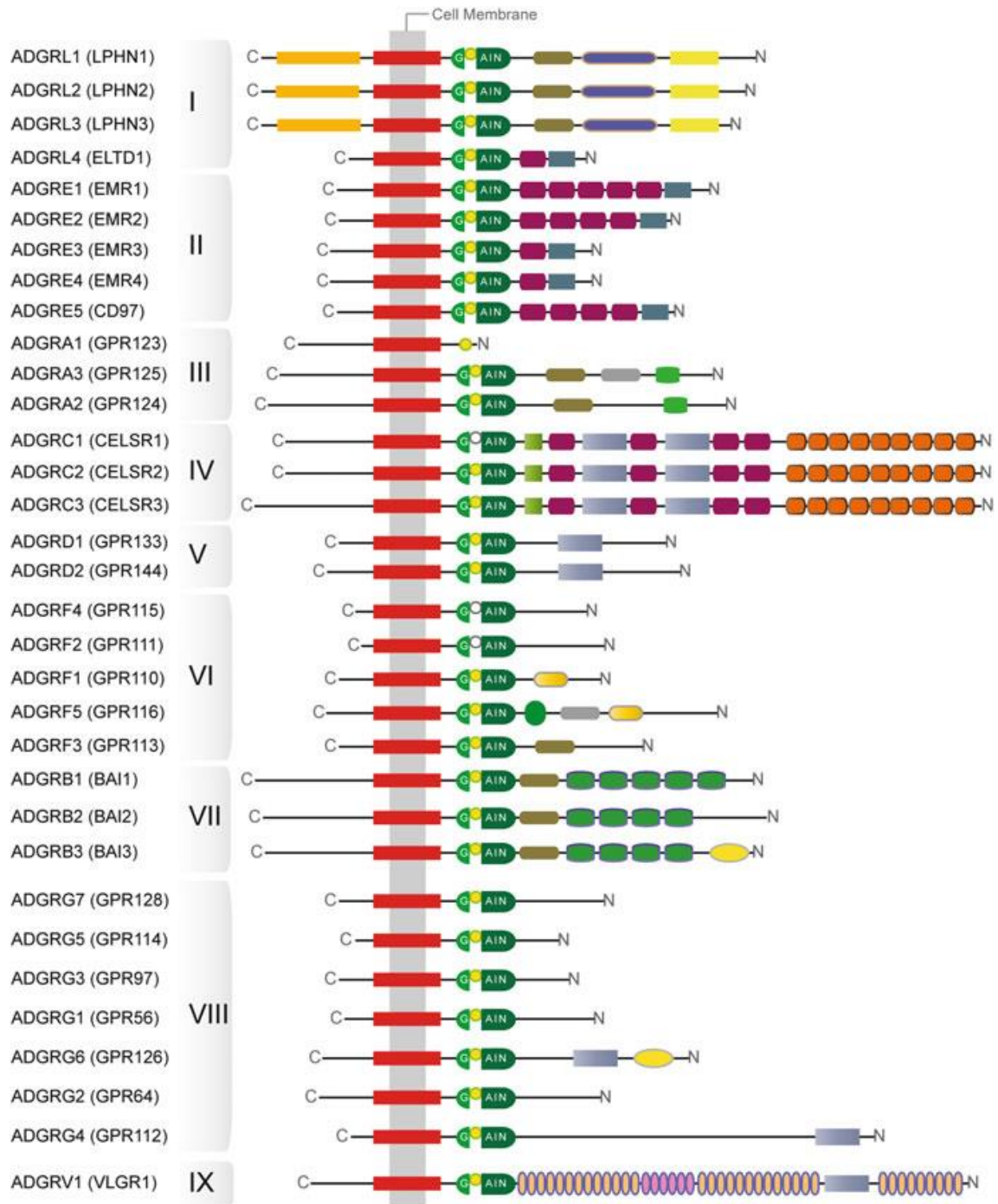


Figura 2. Clasificación y nomenclatura de los aGPCRs. Clasificación y nomenclatura de los aGPCRs propuesta por el consorcio de aGPCRs y el Comité de la Unión Internacional de Farmacología Básica y Clínica sobre Nomenclatura de Receptores y Clasificación de Fármacos. Imagen obtenida de [27].

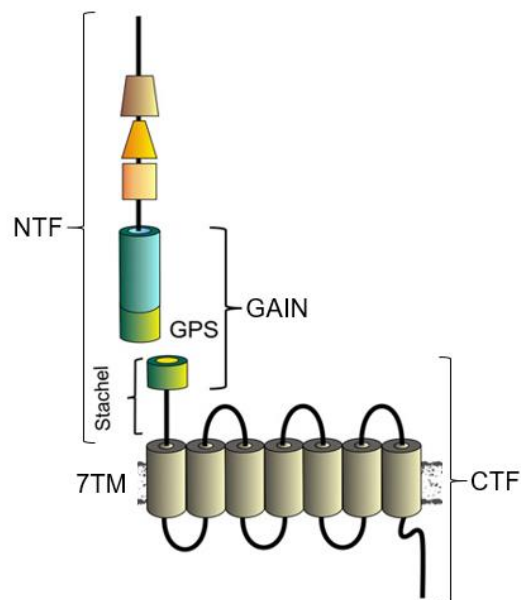


Figura 3. Estructura general de los aGPCRs.

Representación de los diferentes componentes estructurales de un aGPCR. Cuando se lleva a cabo la autoproteólisis del receptor en el dominio GAIN se generan dos fragmentos el NTF y el CTF. Fragmento amino terminal (NTF); fragmento carboxilo terminal (CTF); dominio de inducción de autoproteólisis de GPCR (GAIN); sitio de autoproteólisis de GPCR (GPS); siete regiones transmembranales (7TM). Imagen obtenida de [1].

1.3. GAIN: Un dominio conservado entre los aGPCRs

El dominio GAIN se encuentra conservado en 32 de los 33 miembros de los aGPCRs y se localiza justo antes de los 7TM (Fig.3). Hasta ahora, se ha reportado la estructura cristalina del dominio GAIN de dos aGPCRs diferentes: ADGRL1 y ADGRB3. Estructuralmente el dominio GAIN se compartimentaliza en dos subdominios: un subdominio A integrado por seis alfa hélices y un subdominio B conformado por 13 láminas beta y dos pequeñas alfa hélices. Dentro del subdominio B se encuentra albergado el motivo de proteólisis de GPCR o GPS (el GPS corresponde a las últimas cinco laminas β del subdominio B) que contiene el sitio consenso en donde se lleva a cabo el corte autoprotelítico (HL↓T/S) (Fig. 4A). El sitio consenso se encuentra localizado entre las últimas dos láminas beta del subdominio B (β -12 y β -13) de tal modo que cuando se autoproteoliza el GPS la lámina β -13 se mantiene unida a la región transmembranal del receptor a través de una secuencia corta de ~ 7 aminoácidos [16]. Para que se lleve a cabo la autoproteólisis del GPS se requiere de un correcto plegamiento del dominio GAIN. El mecanismo autocatalítico propuesto para la autoproteólisis del GPS inicia cuando un residuo en la posición P2 (H) del sitio consenso sustrae un hidrógeno de la cadena lateral del aminoácido en la posición P1' (T/S) causando la desprotonación del grupo hidroxilo. Lo anterior induce un ataque nucleofílico sobre el grupo carbonilo del residuo P1 (L) resultando en un éster intermedio que es cortado por el ataque nucleofílico de una molécula de agua, separando al receptor en dos fragmentos

(NTF y CTF) (Fig. 5). El NTF y CTF se mantienen unidos a través de la lámina β -13, que se encuentra rodeada de numerosas interacciones hidrofóbicas y enlaces por puentes de hidrógeno los cuales la mantienen escondida dentro del GAIN evitando que ambos fragmentos se separen (Fig. 4B) [15, 16]. La lámina β -13 también ha recibido el nombre de secuencia Stachel, es una región muy conservada e hidrofóbica capaz de modular la actividad de los aGPCRs funcionando como un agonista anclado que interactúa con las hélices transmembranales [28, 29] (Fig. 7).

Además de ser el dominio en donde se lleva a cabo la autoproteólisis, el dominio GAIN puede mediar interacciones proteína-proteína con moléculas de la matriz extracelular como la laminina y modular la señalización de los aGPCRs a través de proteínas G. De manera importante la región codificante para el dominio GAIN de diferentes aGPCRs (ADGRG1, ADGRB, ADGRL3) ha sido una región blanco para mutaciones relacionadas con enfermedades como la polimicrogiria frontoparietal y el cáncer [30, 31].

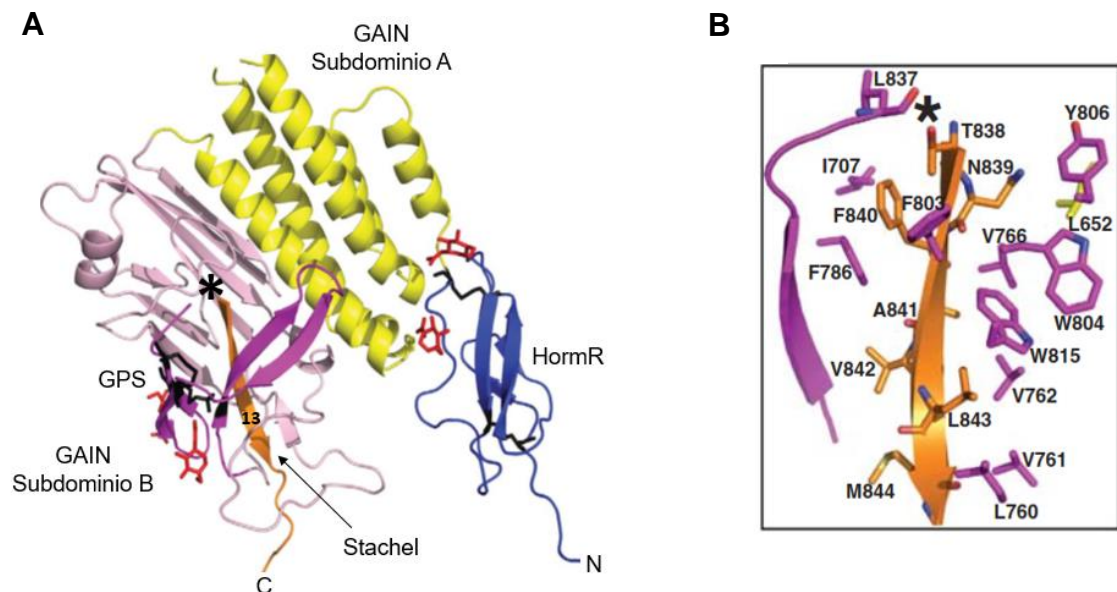


Figura 4. Estructura del dominio GAIN de Lphn1/ADGRL1. (A) Diagrama de la estructura cristalina del dominio GAIN y del dominio de unión a hormona (HRM) de Lphn1 (código de acceso 4DLQ). El subdominio A está representado en color amarillo, el subdominio B en color rosa y la secuencia Stachel en color naranja. El dominio HRM está representado en color azul. El asterisco representa el sitio en donde se lleva a cabo la autoproteólisis dentro el dominio GPS (magenta). (B) Representación de las interacciones hidrofóbicas que rodean a la secuencia Stachel (lamina β -13). Imágenes obtenidas de [16].

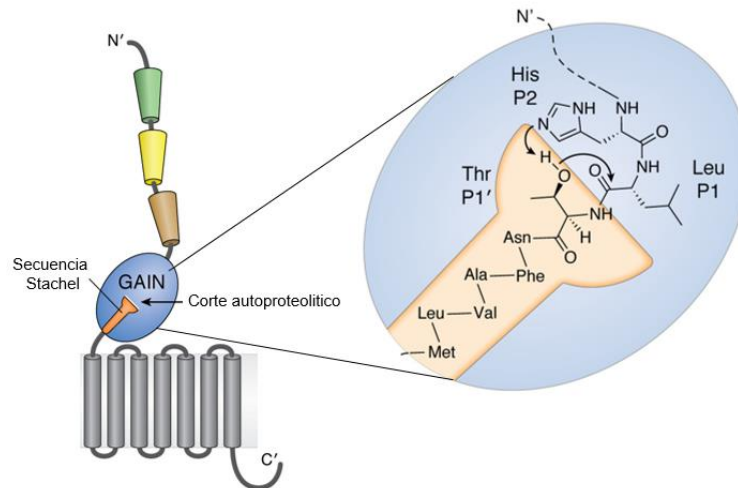


Figura 5. Modelo de la reacción de autoproteólisis en el GPS de Lphn1/ADGRL1. El corte se lleva a cabo entre la leucina (Leu) y la treonina (Thr) a través de una serie de mecanismos que involucran ataques nucleofílicos en donde el dominio GAIN facilita el ambiente químico necesario para que se produzca la reacción autocatalítica. Imagen obtenida de [32].

1.4. Modelos de activación de los aGPCRs

Los aGPCRs son receptores muy dinámicos que poseen diferentes estados y niveles de activación. La falta de estructuras cristalinas de aGPCRs correspondientes a su estructura completa, así como la diversidad de tipos de ligandos (proteínas transmembranales, proteínas de matriz extracelular y proteínas solubles) que interactúan con estos receptores, son factores que han dificultado el entendimiento de los mecanismos de activación de los aGPCRs. En un esfuerzo por entender cómo se activan y señalizan a través de su acople a proteínas G, se han propuesto algunos modelos los cuales están representados en la Fig. 6 y se explican a continuación:

1. Actividad basal: el este estado basal o constitutivo va a comprender las transiciones entre conformaciones activas e inactivas del receptor en ausencia de ligando, por lo tanto el nivel de actividad va depender completamente de las características de cada receptor en donde el NTF y el CTF estarían unidos [32] (Fig. 6A).

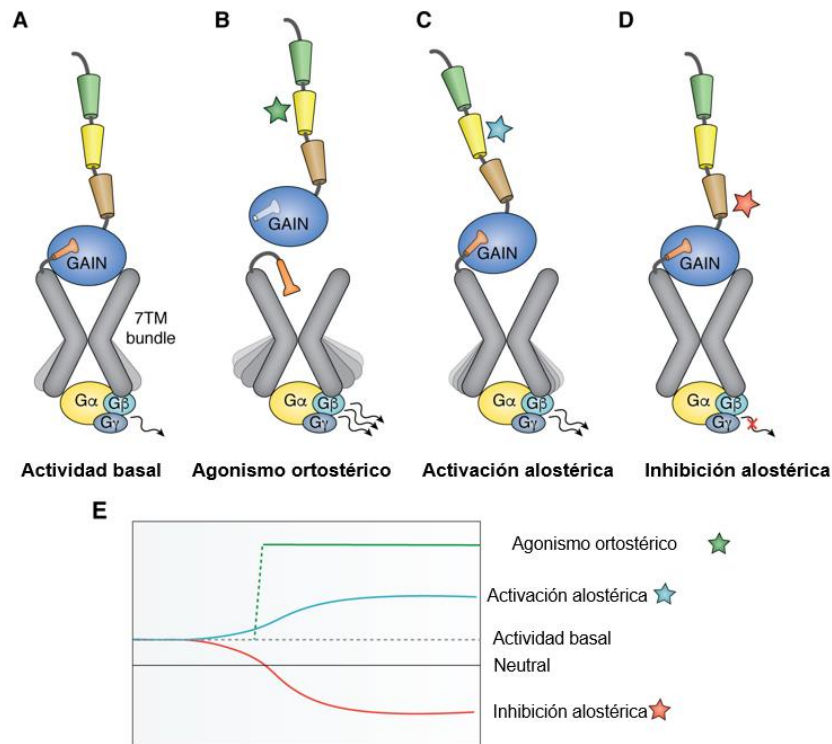


Figura 6. Modelos de activación propuestos para los aGPCRs. (A-D) Esquemas que representan los cuatro modelos de activación que pueden tener los aGPCRs. (E) Gráfica de la señalización relativa obtenida en respuesta a cada modelo de activación. Imagen obtenida de [32].

2. Agonismo ortostérico (agonista anclado): este modelo de activación depende de una secuencia de siete aminoácidos (TXFAVLM) que se localiza al inicio del extremo amino de la secuencia Stachel y que es necesaria para activar a los aGPCRs. La idea de que la secuencia Stachel (o región stalk) podría funcionar como un agonista anclado surgió de estudios en donde la delección del NTF de diferentes aGPCRs, llevó a un aumento en la actividad del receptor, mientras que la remoción de la secuencia Stachel estuvo asociada con la disminución de la activación del receptor a través de su acople a proteínas G. Estas aportaciones dieron lugar a la hipótesis de ligando encriptado, la cual propone que la secuencia Stachel, al ser liberada del dominio GAIN, se une a los dominios transmembranales y activa al receptor [28, 33]. Esta hipótesis es la base del modelo de activación por

agonismo ortostérico, el cual propone que la unión de un ligando a la región extracelular del receptor desprendería el NTF liberando la secuencia Stachel que contiene el agonista anclado (TXFAVLM), el cual interaccionaría con el sitio ortostérico del receptor induciendo su máxima activación [32] (Fig. 6B,E). Este modelo de activación ha sido apoyado mediante estudios de microscopia electrónica criogénica, a través de los cuales se obtuvieron estructuras de alta resolución de varios aGPCRs acoplados al complejo heterotrimérico de proteínas G. La resolución de dichas estructuras reveló que en ausencia del NTF, la secuencia Stachel se localizó dentro de los dominios transmembranales interaccionando con las asas extracelulares y adoptando una configuración de gancho torcido [34-38] (Fig. 7).

3. Activación e inhibición alostérica: los mecanismos de activación o inhibición alostérica aún no están bien definidos. Sin embargo, con base a la evidencia reportada sobre la activación de algunos aGPCRs, este modelo propone que en una configuración en donde ambos fragmentos del receptor permanecen unidos, la unión de un ligando al NTF induce cambios conformacionales que son transmitidos al CTF para activar o inhibir el receptor (Fig. 6C, D). Dada la cercanía del dominio GAIN a los dominios transmembranales, este modelo propone que el GAIN podría funcionar como un centro de regulación para transmitir las señales del NTF al CTF [39, 40].

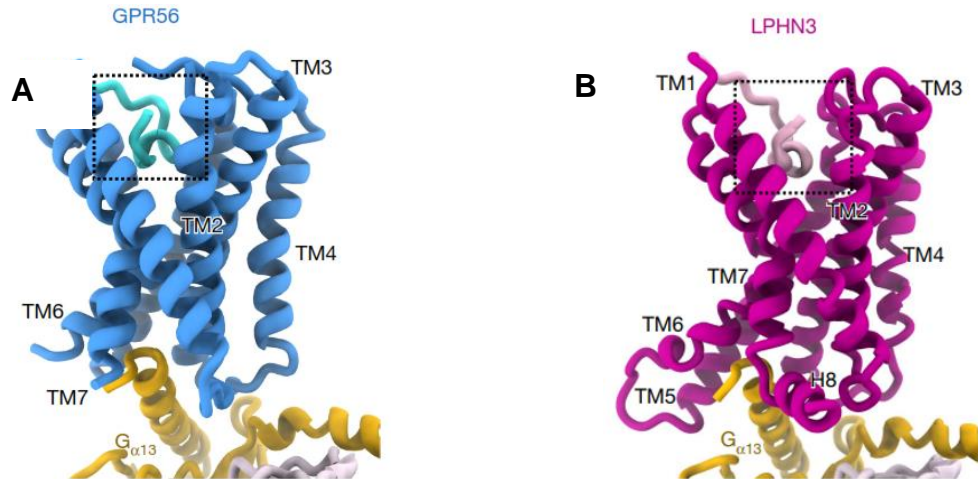


Figura 7. Estructuras de GPR56/ADGRG1 y Lphn3/ADGRL3 acoplados a proteínas G. ADGRG1 (A) y ADGRL3 (B) en su estado activo acoplados a una forma “mini” de la proteína $G_{\alpha 13}$. En ambas estructuras se aprecia la configuración en forma de gancho que adopta la secuencia Stachel dentro de los dominios transmembranales. Imagen obtenida de [34].

1.5. Latrofilinas

Las Latrofilinas (Lphns/ADGRLs) es una de las subfamilias más estudiadas dentro de los aGPCRs. Su nombre deriva de su ligando exógeno latrotoxina, que es una neurotoxina presente en el veneno de la araña *Latrodectus mactnas* [41]. En vertebrados se han descrito tres isoformas de las Lphns (Lphn1-3) las cuales comparten del 54-63% de homología entre sus secuencias, siendo la porción intracelular la región más variable respecto a su región extracelular [42]. Las Lphns 1-3 comparten una estructura similar: el NTF se conforma por un dominio de tipo lectina (LEC), un dominio de tipo olfactomedina (OLF), una región rica en serinas, treoninas y prolinas (STP), una región de unión a hormona (HRM), y su distintivo dominio GAIN. Mientras que su CTF está integrado por su secuencia Stachel, una estructura típica de GPCR y una secuencia al final del extremo carboxilo que es afín a dominios tipo PDZ (Fig.8) [16, 19, 43, 44]. Las Lphns 1-3 se expresan predominantemente en sistema nervioso central, sin embargo, recientemente se ha reportado que algunas isoformas se pueden expresar de manera ubicua en otros tejidos como tejido mamario, cardíaco, pulmonar y pancreático. A nivel funcional, las Lphns 1-3 participan en diversos procesos celulares como la especificidad y mantenimiento de

contactos sinápticos, polaridad tisular, migración de axones, desarrollo embrionario, inflamación y en la liberación de insulina [23, 45-48].

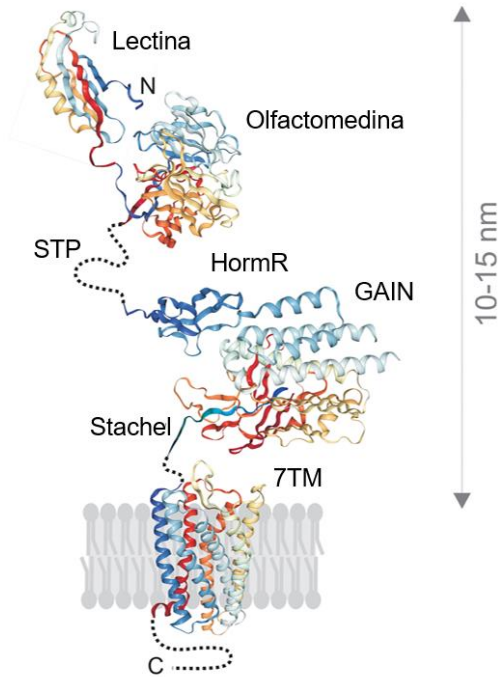


Figura 8. Estructura de las Lphns 1-3.

La imagen muestra una representación 3D de los diferentes dominios que conforman a las Lphns 1-3. El NTF tiene una longitud de 10-15 nm, la cual es suficiente para que pueda mantener interacciones proteína-proteína con sus ligandos en la hendidura sináptica (con un tamaño aproximado de 20nm). Imagen obtenida de [3].

1.6. Latrofilina 3

Como el resto de sus homólogos, la Lphn3 es considerada una molécula bipartita que funciona como molécula de adhesión y como GPCR en diversos procesos celulares que serán abordados a continuación.

A través de ensayos de co-inmunoprecipitación en modelos heterólogos, se reveló que el fragmento CTF (que incluye los 7TM) fue indispensable para que Lphn3 reclutara al citoesqueleto de actina. Además, su expresión estuvo asociada con el incremento de cofilina total y activada, lo cual se vio reflejado en la remodelación del citoesqueleto de actina que afectó drásticamente la morfología celular, generando un fenotipo de baja adherencia presentando estructuras como filopodios y blebs, acompañado del redondeamiento celular [49]. Aunque anteriormente se había descrito que las latrofilinas podían interactuar con proteínas de andamiaje para formar complejos con actina [50],

estos hallazgos representan el primer acercamiento para una función despolimerizante inducida por la expresión de Lphn3.

Otro de los estudios que apoya su rol como molécula bipartita fue el descrito por Moreno-Salinas y colaboradores en donde a través de ensayos de transferencia de energía de resonancia bioluminiscente (BRET) en un modelo heterólogo, se evidenció que así como ocurre con otros GPCRs, Lphn3 (versión completa) en un estado constitutivo mostró promiscuidad para acoplarse a diferentes tipos de proteínas $G\alpha$, que incluyeron: $G\alpha_{i1}$ y 2, $G\alpha_{13}$, $G\alpha_s$ y $G\alpha_q$ [51, 52].

La expresión de Lphn3 se ha reportado tanto en condiciones normales como patológicas. De manera normal, Lphn3 se expresa en diversas regiones del cerebro como la corteza prefrontal, núcleo caudado, amígdala, cuerpo calloso e hipocampo [53]; su expresión también ha sido reportada en islotes de Langerhans y en tejido mamario [23, 47, 54, 55].

En relación a su alta expresión en sistema nervioso central, la mayoría de las investigaciones enfocadas al estudio de Lphn3 están asociadas con su función como receptor neuronal en la formación de contactos sinápticos. En este sentido, Sando y colaboradores en el 2021 reportaron que esta función requiere tanto de las propiedades de adhesión como de señalización de Lphn3 para el establecimiento de sinapsis excitatorias en el hipocampo. La formación de sinapsis mediada por Lphn3 requiere de su interacción con sus ligandos endógenos: teneurinas y las proteínas transmembranales con repetidos de leucina y fibronectina (FLRTs), con los cuales Lphn3 interacciona de manera conjunta para formar complejos proteicos heterotriméricos. Aunque aún no se esclarecen las vías de señalización desencadenadas por la activación de Lphn3 en la sinaptogénesis, en el mismo trabajo de Sando y colaboradores, se evidenció que la ausencia de la región intracelular de Lphn3 estaba relacionada con la disminución del número de sinapsis glutamatérgicas [46, 56-59].

En el 2019, a través del análisis por RT-PCR de líneas celulares derivadas de islotes pancreáticos de ratón y humano, se identificaron dos variantes de Lphn3 que fueron diferentes a la descrita en el cerebro (variante P1 y P2). Estas dos nuevas variantes en células beta-pancreáticas carecieron del exón 23, lo que originó el acortamiento de la

tercera asa intracelular. De manera interesante, la variante P2 también careció del exón 8 que correspondió a una región corta del amino terminal del dominio OLF. Cuando se analizó su perfil de señalización por proteínas G, se reportó que las variantes pancreáticas en su estado basal y activado señalaron por Gai, lo cual contrastó con la señalización de la variante del cerebro que no mostró actividad por dicha vía. La señalización por Gai producto de la activación de las variantes pancreáticas estuvo relacionada con una disminución de la liberación de insulina a través de la regulación de los niveles de AMPc [23]. Estos hallazgos resaltan la importancia de Lphn3 en procesos metabólicos como la homeostasis de la glucosa.

Por otro lado, la expresión de Lphn3 también ha sido relacionada con alteraciones en el estado fisiológico que desencadenan enfermedades como el asma y el cáncer. En un estudio en donde compararon los perfiles de expresión genético de cultivos primarios de células del musculo liso de las vías respiratorias (ASMC) de pacientes sanos y pacientes con asma, Lphn3 estuvo dentro de los primeros 10 genes sobreexpresados, y este resultado coincidió con el incremento del RNAm y de proteína de Lphn3 en células ASMC de pacientes con dicho padecimiento. La función de Lphn3 en este tipo celular estuvo relacionada con su activación a través de su ligando Flrt3, favoreciendo propiedades de adhesión, proliferación y contracción de células ASMC de pacientes asmáticos respecto a células normales. Aunque este estudio presentó algunas limitaciones, como por ejemplo, un número reducido de pacientes que conformaron la población de análisis, sus resultados abren nuevas perspectivas funcionales sobre la participación de Lphn3 en otros tipos celulares [60].

La relación de Lphn3 con el cáncer es un tema de investigación bastante reciente. Uno de los hallazgos que cuestionaron la participación de Lphn3 en este padecimiento, fue un estudio en 2010 donde se realizó el análisis de 1507 genes de 441 muestras de diferentes tipos de cáncer (mama, ovario, pulmón y próstata) con el propósito de caracterizar mutaciones somáticas para identificar posibles blancos terapéuticos. En este análisis, Lphn3 estuvo dentro de los 77 genes más mutados y las mutaciones de un solo nucleótido fueron restringidas a la región del dominio GAIN [30]. Por su parte en 2012, a través de RT-PCR se identificó un aumento del RNAm de Lphn3 en muestras de tejidos

provenientes de pacientes con cáncer de mama, lo cual coincidió con un reporte en 2020 donde se detectó por inmunohistoquímica un incremento de la señal para Lphn3 en muestras de pacientes tailandeses con cáncer de mama respecto a pacientes sanos [54, 55]. En este último estudio, la intensidad de señal para Lphn3 estuvo relacionada con tumores menos agresivos sugiriendo que Lphn3 podría estar involucrada en diferentes etapas de la progresión del cáncer. En este mismo contexto, otro estudio en 2019 reveló la presencia de Lphn3 en muestras de pacientes con cáncer de mama a través de un análisis por Western blot. Adicionalmente, también se realizó el cribado de la expresión de Lphn3 en diferentes líneas celulares consideradas no cancerígenas (RC-124, PHL, HaCat y Beas-2B) y cancerígenas, reportando la presencia de Lphn3 únicamente en líneas celulares provenientes de tejido maligno (THP1, LAD2, Hep-G2, BCB701, MCF-7, PC3 y Calu6) [47]. Recientemente en enero de 2022, con la idea de entender la evolución molecular que da lugar al desarrollo de los ependimomas (tumores de células gliales), el análisis genético de siete muestras tumorales provenientes del mismo paciente (un tumor primario y 6 tumores recurrentes) mostraron que el gen de Lphn3 estuvo consistentemente mutado durante el desarrollo de la enfermedad, y su expresión estuvo inversamente relacionada con el grado tumoral del ependimoma de ese paciente [61]. Todos estos antecedentes parecen indicar que Lphn3 está activamente relacionada con la carcinogénesis y que se requieren de más estudios para dilucidar sus posibles funciones.

1.6.1. Ligandos endógenos de Lphn3

Las teneurinas son moléculas de adhesión tipo II es decir que la región carboxilo terminal se localiza en el compartimento extracelular. Estructuralmente se conforman de un dominio intracelular que contiene dominios de unión-SH3 ricos en prolina, una región transmembranal, y su región extracelular constituida por: ocho repetidos tipos factor de crecimiento epidermal (EGF), un dominio tipo Ig, un dominio tipo beta-propela que contiene una serie de repetidos NHL, un dominio en forma de barril, rico en repetidos YD, un dominio tipo toxina Tc bacteriana, y una región de ~ 40 aminoácidos conocida como péptido asociado al carboxilo terminal de teneurina (TCAP) [2] (Fig.8). En mamíferos, la familia de las teneurinas se encuentra integrada por cuatro isoformas las cuales se expresan diferencialmente durante el desarrollo del sistema nervioso central [62]. En el cerebro

adulto, su expresión ha sido reportada en las regiones CA1-3 del hipocampo, en el giro dentado y corteza visual, teniendo una importante función en la formación y mantenimiento de contactos neuronales que forman parte de circuitos como el del hipocampo y el olfatorio [63].

A través de su región extracelular, las teneurinas cumplen su función como moléculas de adhesión estableciendo interacciones homofílicas y heterofílicas. Cada una de las cuatro isoformas de las teneurinas puede interactuar con Lphn3 en una configuración transcelular independiente a calcio a través de su dominio tipo toxina el cual reconoce al dominio LEC de Lphn3 (aunque la participación del dominio de OLF de Lphn3 permite una unión de mayor afinidad). Esta interacción induce señalización transcelular que disminuye los niveles de AMPc en una manera dependiente de Lphn3. Además, la región extracelular de las teneurinas puede sufrir procesos de proteólisis que liberan fragmentos como el TCAP, el cual también se sugiere podría ser un ligando para Lphn3 [19, 46, 59, 64, 65].

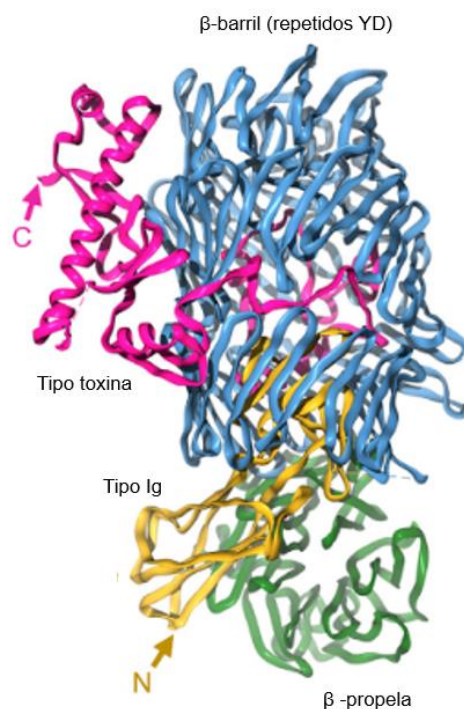


Figura 9. Estructura de la región extracelular de teneurina 2. Estructura 3D de la región carboxilo de teneurina 2 obtenida por microscopía electrónica criogénica. El modelo revela un plegamiento tipo barril (azul) sellado en la parte inferior por el dominio tipo Ig (amarillo) y decorado por el dominio tipo β -propela (verde). En la parte superior se encuentra el dominio tipo toxina (rosa, que también incluye el TCAP) el cual está parcialmente incrustado en el interior del β -barril. Imagen obtenida de [2].

La segunda familia de proteínas de membrana que son ligandos endógenos para Lphn3 pertenecen a la familia Flrt [66]. Estas proteínas son moléculas de adhesión tipo I que están involucradas en procesos de migración celular, desarrollo neuronal y en la direccionalidad de axones. En vertebrados se han identificado tres isoformas que se expresan de manera ubicua incluyendo el cerebro. Estructuralmente presentan una región transmembranal y una región extracelular conformada por diez repetidos tipo leucina (LRR) y un dominio tipo fibronectina 3. Los LRR son la región primordial para el establecimiento de sus interacciones en procesos de adhesión o repulsión [56]. En neuronas, estas proteínas pueden mediar eventos de adhesión a través de interacciones homofílicas o de repulsión a través de su interacción con proteínas de la familia Unc [57, 67]. Lphn3 interacciona con las tres isoformas de la familia Flrt y esta interacción es de alta afinidad e independiente de calcio mediada por el dominio de OLF de Lphn3 y los LRR de Flrt [66]. Específicamente, la interacción entre Lphn3-Flrt3 es importante para la formación de sinapsis excitatorias en hipocampo, mientras que en un modelo heterólogo se reportó que esta interacción induce la activación de Lphn3 para señalizar por $G\alpha_{13}$ [52, 59]. A través de microscopía electrónica criogénica, se evidenció que la conformación estructural de la LRR tiene la apariencia de un arco, y esta peculiar conformación permite que Lphn3 y Unc5 puedan coexistir en el mismo complejo facilitado por Flrt. Es aquí donde Lphn3 interacciona con la superficie del lado convexo y Unc5 con la superficie del lado cóncavo de LRR, manteniendo una dinámica de interacción no competitiva [44].

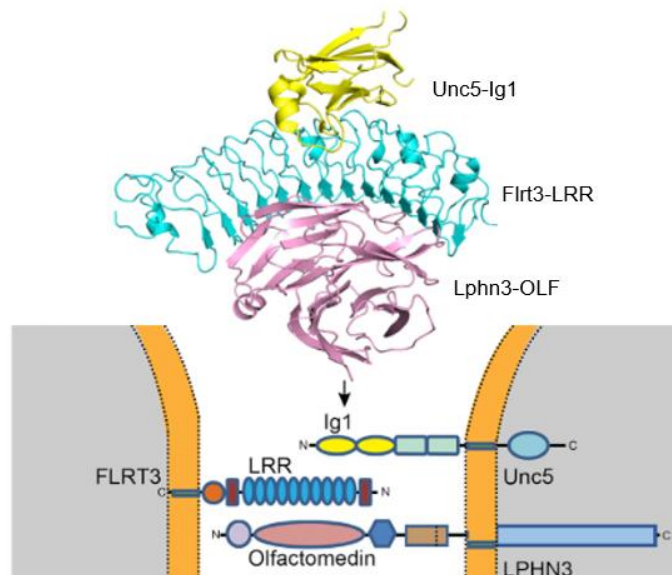


Figura 10. Representación de la interacción transcelular entre Lphn3 y Flrt3. El diagrama muestra a Lphn3, Flrt3 y Unc5 formando un complejo de interacción transcelular. En la parte superior se puede observar la peculiar estructura de LRR con forma de arco (cian) que permite que el dominio OLF (rosa) de Lphn3 y el dominio Ig (amarillo) de Unc5 puedan interactuar al mismo tiempo. Imagen obtenida de [44].

1.7. Generalidades del cáncer

De acuerdo a la organización mundial de la salud, el cáncer representa la principal causa de muerte en el mundo. Tan solo en 2020, una de cada seis defunciones fueron a causa de algún tipo de cáncer, siendo los tipos más comunes: mama, pulmón, colon, recto y próstata [68].

El cáncer es definido como un conjunto de enfermedades que se caracteriza por el crecimiento anormal y descontrolado de las células del cuerpo que da lugar a la formación de pronunciadas masas celulares conocidas como neoplasias. La carcinogénesis es un proceso con múltiples etapas en donde las células adquieren habilidades maestras para manipular mecanismos celulares y moleculares que favorezcan su crecimiento y supervivencia. Dentro de estas capacidades se incluyen: señalización sostenida para proliferar, evasión de supresores del crecimiento, inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis, resistencia a la muerte celular, características para invadir otros tejidos, reprogramación metabólica, destrucción y evasión del sistema inmune, inestabilidad

genómica e inflamación; todas estas características cooperan para potenciar la malignidad celular y forman parte de los rasgos distintivos del cáncer [69, 70]. La variedad de proteínas que participan en todos los diferentes mecanismos antes mencionados es sumamente vasta, por lo que en este trabajo nos enfocaremos en conocer un poco acerca de las funciones de las moléculas de adhesión y los GPCRs en el desarrollo del cáncer.

1.7.1. Adhesión celular y cáncer

Uno de los mecanismos clave que potencian la progresión tumoral a metástasis es la transición epitelio-mesénquima o TEM. La TEM es un mecanismo muy dinámico, transitorio y reversible que lleva a las células epiteliales a perder su polaridad apical-basal, contactos célula-célula y adherencia a la membrana basal, así como también a remodelar su citoesqueleto de actina y expresar marcadores mesenquimales. Estos últimos son regulados por factores de transcripción que pueden variar en dependencia del tipo de celular, sin embargo, TWIST1/2, SNAIL1/2, ZEB1 y FOXC2 son considerados como factores indispensables desde la iniciación hasta la metástasis [71, 72].

La pérdida de la adhesión es una de las características pro-tumorigénicas que se observan durante el inicio de la TEM como consecuencia del cambio en el perfil de expresión de moléculas de adhesión como las cadherinas e integrinas. La disminución de la expresión de E-cadherina en las células que sufren esta transición, promueve la pérdida de interacciones intercelulares que favorece la liberación de las células del tumor primario; esta disminución está acompañada por el incremento en la expresión de marcadores mesenquimales como N-cadherina que participa en la activación de receptores como el receptor del factor de crecimiento fibroblástico y la vía de señalización de Wnt, por ejemplo, para contribuir en la activación de vías mitogénicas, incremento en la motilidad e invasión celular [73, 74].

En el cáncer, los procesos de invasión dependen en gran medida del balance entre E-cadherina e integrinas. Las integrinas son proteínas de membrana que comunican a la matriz con el interior celular a través del ensamble de un gran complejo proteico conocido como adhesoma; que permite reclutar al citoesqueleto de actina para que en conjunto durante la invasión y metástasis modulen procesos como migración celular,

desprendimiento de las células de la matriz extracelular y colonización tumoral [75]. Muchas de las funciones dependientes de las integrinas están relacionadas con la activación de las cinasas FAK y Src por lo que estas últimas, tienen una gran función en el cáncer por su habilidad para promover proliferación y resistencia en células tumorales [76].

La variabilidad del perfil de expresión de moléculas de adhesión durante el cáncer impacta de manera importante la plasticidad de uniones célula-célula y célula-matriz lo que conduce a distintos modos de migración en donde las integrinas participan activamente en la migración tipo mesenquimal a través del establecimiento de adhesiones focales [77]. En este proceso la participación del citoesqueleto es crucial para mantener contactos celulares estables y también para mediar la forma celular y la dinámica de la formación de estructuras como filopodios, lamelipodios, blebs y fibras de estrés, necesarias para la migración y la invasión. Es ampliamente aceptado que los integrantes de la familia de las Rho-GTPasas son los maestros en controlar las dinámicas del citoesqueleto de actina; de los cuales los mejor caracterizados son: Cdc42 para la formación de filopodios, Rac que guía la señalización para la formación de lamelipodios y RhoA que promueve la formación de fibras de estrés y blebs [78-80]. Dependiendo del contexto tumoral, las células cancerosas pueden activar y transitar por diferentes mecanismos de migración que les permiten atravesar diferentes barreras como membranas basales, paredes vasculares o moverse por espacios pequeños presentes en tejido conectivo para poder alcanzar su tejido blanco. En el tipo de migración mesenquimal las células tumorales mantienen una forma alargada polarizada que se caracteriza por la presencia de lamelipodios, filopodios y fibras de estrés que colaboran para mantener la adhesión y las fuerzas de tracción con la matriz, necesarias para poder desplazarse; este tipo de migración depende de la secreción de proteasas como las metaloproteinasas para la remodelación de la matriz y es usado por la célula para migrar de manera colectiva o individual. En este tipo de migración la alta expresión de otros elementos del citoesqueleto como la vimentina, que es un filamento intermedio y considerado un marcador mesenquimal, es crucial para potenciar la migración y la invasión celular [71, 72].

Existe un segundo mecanismo de migración conocido como migración ameboide, es usado por células individuales y se activa durante ciertas circunstancias que involucran: una disminución de la adhesión célula-matriz, pérdida de la proteólisis de la matriz, aumento de la contractilidad de actomiosina mediada por la actividad de miosina II y RhoA y desestabilización de microtúbulos que induce una morfología celular redondeada. La interconversión de un modo de migración mesenquimal a ameboide, conocida como transición mesénquima-ameboide (TMA) es un mecanismo reversible y muy dinámico en donde las GTPasas como RhoA y Rac transitan en estados activos e inactivos para regular la remodelación del citoesqueleto de actina. A diferencia del estilo mesenquimal, en la migración ameboide las células se mueven más rápido y se propone que la TAM es una estrategia utilizada para aumentar su eficiencia durante la metástasis [81, 82].

1.7.2. Participación de los GPCRs en cáncer

El amplio alcance funcional de los GPCRs sobre una variedad de procesos celulares los convierte en proteínas clave para influenciar las características distintivas del cáncer en donde su participación puede estar en función de la presencia de mutaciones con ganancia o pérdida de función o en su mera expresión. De acuerdo al catálogo de mutaciones somáticas en cáncer (COSMIC) los GPCRs y las proteínas G se encuentran mutados aproximadamente en el 20% de todos los cánceres [83] y través del análisis de estructuras 3D se ha revelado que la mayoría de las mutaciones en GPCRs asociadas a cáncer suelen presentarse en puntos calientes estructurales, como en el caso de otros oncogenes o genes supresores de tumores. Por ejemplo, en GPCRs de la familia Rodopsina, mutaciones relacionadas a cáncer se han encontrado en la arginina del motivo DRY que es importante para la activación de estos receptores y responsable para los contactos polares intramoleculares que mantienen al receptor inactivo ante la unión del ligando [5, 84]. En otro análisis reciente sobre mutaciones de GPCRs en diferentes neoplasias humanas, se reveló que en cáncer gástrico se encontró una mayor cantidad de GPCRs mutados que se acoplaron a *Gas* y *Gai/o* impactando en los niveles de AMPc [84]. Otros ejemplos son el aGPCR ADGRV1 que es de los receptores frecuentemente mutados en muchos tipos de cáncer como el de melanoma cutáneo, el GPCR FZD6 perteneciente a la familia Frizzled que es frecuentemente mutado en adenocarcinomas de colon y el receptor S1P1 el cual

promovió la progresión tumoral, en linfoma de células B grandes, producto de mutaciones que afectaron su señalización por $G\alpha_{13}$ [85, 86].

En relación a su sobreexpresión también hay diferentes ejemplos de la relación de los GPCRs con el cáncer. La familia de Frizzled está ampliamente involucrada en cáncer como transductores de la señalización por Wnt, y la señalización por Wnt puede desencadenar la activación de beta catenina en cáncer de colon y promover la proliferación celular [86]. Respecto a los GPCRs de adhesión, el receptor ADGRE2 es sobreexpresado en cáncer de mama mientras que CD97 y GPR56 son también altamente expresados en la mayoría de todos los cánceres siendo hasta ahora estudiados en el contexto de cáncer gástrico, melanoma, esófago y tiroides [21, 87].

Dentro de los GPCRs de la familia Rodopsina los receptores CXCR4 y CCR7 representan los receptores tipo quimiocina mejor estudiados que potencian la metástasis, teniendo funciones activas en crecimiento tumoral, invasión, angiogénesis, metástasis y resistencia terapéutica [88].

La estimulación de angiogénesis es una componente crucial de la progresión del cáncer. Factores liberados por el tumor, como prostaglandinas y trombina, a menudo actúan sobre GPCRs como por ejemplo S1PR, PAR1 y CXCR4-7, para potenciar la estimulación de mediadores angiogénicos como el factor de crecimiento vascular-endotelial fibroblastoide (VEGF). La estimulación de PAR2 por trombina induce la expresión y liberación de VEGF, incrementando la permeabilidad vascular para crear un ambiente favorable de la vascularización [88, 89].

De manera general la señalización de los GPCRs puede desencadenar funciones que favorezcan o limiten la progresión tumoral durante el desarrollo de la enfermedad por lo que el estudio de sus funciones sigue siendo de relevancia para el entendimiento y abordaje terapéutico del cáncer.

2. Justificación

A pesar de que se desconocen las funciones de Lphn3 durante la carcinogénesis, sus propiedades de adhesión, su acoplamiento con proteínas G α y su actividad en la remodelación del citoesqueleto de actina son procesos celulares relacionados con el desarrollo de cáncer. La identificación de mutaciones en la región más conservada de los aGPCRs que es el dominio GAIN llevó a cuestionarnos si este dominio podría participar en otros procesos además de la autoproteólisis del receptor. Por tal motivo, el estudio de variantes en el dominio GAIN relacionadas con cáncer representaría una herramienta importante para revelar funciones desconocidas del dominio GAIN en un contexto fisiopatológico. Así pues, en este trabajo caracterizamos el efecto de cinco mutaciones K⁵⁶¹N, A⁷⁶⁰G, D⁷⁹⁸H, S⁸¹⁰L y E⁸¹¹Q que fueron previamente identificadas en muestras de pacientes con cáncer de pulmón utilizando un sistema de expresión heterólogo.

3. Hipótesis

El dominio GAIN de Lphn3 además de modular la autoproteólisis del receptor, participa en la modulación de otros procesos celulares como la adhesión y la migración celular.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Estudiar la función fisiopatológica del dominio GAIN de Lphn3, a través del análisis de mutaciones con cambio de sentido reportadas en adenocarcinoma de pulmón.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto de las mutaciones K⁵⁶¹N, A⁷⁶⁰G, D⁷⁹⁸H, S⁸¹⁰L y E⁸¹¹Q en la adhesión celular entre el receptor Lphn3 y sus ligandos Flrt3 o teneurina 2.
- Evaluar el efecto de las mutaciones K⁵⁶¹N, A⁷⁶⁰G, D⁷⁹⁸H, S⁸¹⁰L y E⁸¹¹Q en el procesamiento auto proteolítico del GAIN y en la expresión en la membrana celular.
- Analizar el impacto de las mutaciones K⁵⁶¹N, A⁷⁶⁰G, D⁷⁹⁸H, S⁸¹⁰L y E⁸¹¹Q en la señalización por G α 13 y en la remodelación del citoesqueleto de actina y vimentina.

- Comparar los efectos de Lphn3 y las mutaciones K⁵⁶¹N, A⁷⁶⁰G, D⁷⁹⁸H, S⁸¹⁰L y E⁸¹¹Q en procesos de migración celular.

5. Métodos

Los materiales, reactivos y soluciones utilizadas en los diferentes métodos experimentales vienen descritos en el apartado de apéndices.

5.1. Plásmidos de expresión

Las construcciones plasmídicas de Lphn3 de humano y los correspondientes mutantes del dominio GAIN con las etiquetas Flag y Hemaglutinina (Lphn3^{Flag/HA}) fueron descritos previamente [16]. Los plásmidos mutantes del GAIN de Lphn3 acoplados a mVenus fueron generados a partir del plásmido Lphn3^{HA/Flag}-mVenus [49] el cual fue cortado por las enzimas EcoRI y Bsu36I para liberar y purificar el fragmento que contenía la secuencia de mVenus; esta misma estrategia se realizó con los plásmidos que codificaron para cada mutante, pero en este caso para liberar y purificar el fragmento codificante para cada variante de Lphn3. Finalmente se realizó la ligación de ambos fragmentos purificados (Fig. 16). Los constructos de Teneurina2 y Flrt3 transmembranales, así como el plásmido de expresión de Flrt3 humano fusionado con Ig soluble (Flrt3^{ECD}-Fc), fueron descritos previamente [19, 90]. El biosensor G13 basado en TRUPATH BRET fue una donación de Bryan Roth (kit Addgene #1000000163).

5.2. Cultivo celular

La línea celular HEK293 procedente de ATCC se sometió a pruebas para detectar la presencia de Micoplasma. Las células fueron cultivadas en medio DMEM (Tabla 2) en una atmósfera a 37 °C y 5 % de CO₂.

5.3. Transfecciones transitorias

Las transfecciones transitorias se realizaron utilizando una relación 1:3 de ADN-PEI. Para 1.8 x 10⁶ células/pocillo, se preparó el siguiente complejo ADN-PEI a temperatura ambiente: 240 µl de DMEM, 4 µg de ADN plasmídico y 12 µl de PEI [1 µg/µl]. El complejo fue incubado por 30 min y luego completado a 1 ml con DMEM. Posteriormente, éste fue añadido a las células gota a gota y se dejó incubar por 30 min en condiciones de

cultivo. Finalmente se agregó a las células 1 ml de medio DMEM suplementado con 20% de SFB, 2000 U ml⁻¹ de penicilina-estreptomicina y 4 mM de GlutaMAX. Después de 19 horas de incubación, se sustituyeron los medios de cada pocillo por 2 ml de medio DMEM. Para los ensayos de BRET, las células se cotransfectaron con 12.5 ng de cada plásmido del biosensor BRET2: G α 13, G γ 9 y G β 3; 50, 250 y 750 ng del plásmido Lphn3^{HA/Flag} o las variantes y la cantidad final de ADN se ajustó a 1000 ng con el vector vacío.

5.4. Ensayo de agregación celular

Células HEK293 se cotransfectaron siguiendo el siguiente esquema: las células transfectadas con receptores recibieron 0.5 μ g de ADN del plásmido codificante para EGFP y 3.5 μ g de ADN plasmídico de las variantes de Lphn3. Mientras que las células transfectadas con ligandos recibieron 1 μ g de ADN del plásmido que codifica DsRed con 3 μ g de plásmidos que codifican los ligandos (Teneurina 2 y Flrt3). Tras 48 h de transfección, cada población celular se cosechó utilizando 1 mM de EGTA en PBS que contenía 25 ng de DNasa y se resuspendieron mediante sucesivos pasos de aspiración-liberación a través de pipetas Pasteur siliconadas. Las muestras de agregación se formaron mezclando células que expresaron el receptor con las que expresaron el ligando (proporción 1:1 en DMEM que contenía 50 mM de HEPES-NaOH pH 7,4, 10 % de SFB, 10 mM de CaCl₂ y 10 mM de MgCl₂) y se incubaron durante 2 h bajo rotación constante a temperatura ambiente. Se colocaron alícuotas en portaobjetos y las imágenes fueron adquiridas utilizando un objetivo 10X del microscopio de epifluorescencia Observer.Z1 (Zeiss, Göttingen). El análisis de las imágenes fue realizado con Fiji-ImageJ. El índice de agregación, representado en porcentaje (%), se obtuvo calculando la relación entre la suma de las áreas de las partículas que superaron el límite de la condición control entre la sumatoria de las áreas totales.

5.5. Producción y purificación de Flrt3^{ECD}-Fc

La producción de la versión soluble de Flrt3 (FLRT3^{ECD}-Fc) se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por [90]. Brevemente, después de 96 h de transfección con FLRT3^{ECD}-Fc, se colectaron los medios de células HEK293 y se centrifugaron para eliminar los restos celulares. Para inmovilizar FLRT3^{ECD}-Fc, los medios condicionados se incubaron a 4 °C

toda la noche con perlas de sefarosa acopladas a proteína A. Tras una serie de lavados, las proteínas fueron eluidas de las perlas con una solución de 4 M de $MgCl_2$ y se dializaron a través de columnas con poros de 100 kDa. El eluido final se analizó mediante geles de SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie. La cuantificación se realizó mediante análisis de densitometría utilizando Fiji-ImageJ.

5.6. Ensayo de marcaje de superficie celular

Después de 48 h de transfección, las células HEK293 transfectadas con los plásmidos para las variantes del receptor Lphn3 fueron incubadas toda la noche a 4 °C con DMEM, que contenía 10 nM de Flrt3^{ECD}-Fc, 50 mM de HEPES-NaOH pH 7.4, 2 mM de $CaCl_2$ y 2 mM de $MgCl_2$. Posteriormente, las células se fijaron con PFA al 4% durante 15 minutos en agua-hielo. Para saturar posibles sitios de unión inespecífica, las células fueron incubadas con 3% de BSA en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. La inmunodetección de las variantes del receptor de Lphn3^{Flag/HA} se logró a través del anticuerpo policlonal anti-Flag (proporción 1:500 en solución de bloqueo) durante 2 h a temperatura ambiente y un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a Alexa 633 (proporción 1:500 en solución de bloqueo) durante 1 h a temperatura ambiente. La unión de Flrt3^{ECD}-Fc se detectó utilizando un anticuerpo anti-Fc humano acoplado a Alexa 488 (proporción 1:500 en solución de bloqueo) durante 1 h a temperatura ambiente. Los núcleos se tiñeron utilizando 300 nM DAPI en PBS durante 5 min. Las imágenes se capturaron mediante microscopía confocal utilizando el microscopio Leica SP8 (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania) con un objetivo de inmersión de 63X (apertura numérica [AN]: 1,4) y 0.4 μm de espacio entre cada corte.

5.7. Western blot

A las 48h de transfección, las células HEK293 transfectadas con plásmidos de las variantes del receptor Lphn3 fueron lisadas en buffer Laemmli y procesadas por SDS-PAGE usando geles de acrilamida al 10 %, para después ser transferidas a membranas de nitrocelulosa. Para evitar pegado inespecífico, las membranas se incubaron con BSA al 3 % en TBST 1X durante 2 horas a temperatura ambiente y la detección se realizó con los anticuerpos primarios: anti-HA monoclonal de ratón, anti-Flag policlonal de conejo (proporción 1:1

000 en la solución de bloqueo) y anti-vimentina V9 monoclonal de ratón (proporción 1:250 en solución de bloqueo), seguidos de anticuerpos secundarios anti-conejo IRDye680RD y anti-ratón IRDye800CW (proporción 1:15 000 en solución de bloqueo). Finalmente, para cuantificar las señales fluorescentes, las membranas fueron escaneadas con los canales de 700 nm y 800 nm del fotodocumentador Fc Odyssey de LI-COR Biosciences.

5.8. Detección de la expresión del receptor en la superficie celular (DECS)

Tras 24 horas después de transfección, células HEK293 transfectadas con vector vacío o con los plásmidos de las variantes del receptor se transfirieron placas de 96 pocillos tratadas con poli-L-Lisina y se cultivaron durante 24 h. A continuación, las células se fijaron con PFA al 4% durante 10 minutos en agua-hielo y se incubaron en una solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. La detección se realizó usando un anticuerpo policlonal anti-Flag (proporción 1:20 000 en una solución de bloqueo que contenía azida sódica al 0.1%) y un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a HRP (proporción 1:2 000 en solución de bloqueo). La reacción colorimétrica se indujo añadiendo el sustrato cromogénico de la peroxidasa de rábano TMB, dando lugar a una solución de color azul, a la que se le añadió 1 N H₂SO₄ virando a un color amarillo. La lectura de absorbancia se realizó a 450 nm utilizando el lector de microplacas Cytation 5 (Biotek).

5.9. Ensayos de transferencia de energía de resonancia bioluminiscente (BRET)

Evaluamos la actividad constitutiva de Lphn3 a través de la vía G13 utilizando el biosensor TRUPATH para G13 (G α 13-RLuc8, GY9-GFP2 y G β 3) [91]. Las células HEK293 (3.5x10⁵ células) se cotransfectaron con las cantidades indicadas de constructos individuales que codificaron las variantes de Lphn3 (0, 50, 250 y 750 ng) junto con el biosensor de G13, utilizando una proporción de ADN de 1:1:1 para cada uno de los componentes del biosensor (12.5 ng), distribuyendo equitativamente en 10 pozos de una placa de 96 pocillos de color blanco. Tras 48 h de transfección, los medios celulares se sustituyeron por buffer BRET a temperatura ambiente y se inició la reacción bioluminiscente añadiendo 5 μ M de coelenterazina 400^a, que es el sustrato de RLuc8,

seguido de una fase de equilibrio de 5 min. Las señales de emisión filtradas a través de filtros de paso de banda de 515/40 nm y 410/80 nm correspondientes a la longitud de onda de emisión de GFP2 y Rluc8, respectivamente, se adquirieron utilizando el lector de microplacas Cytation 5 (Biotek) y se utilizaron para determinar BRET2 “ratio”: emisión del aceptor/donador (Em GFP2/ Em Rluc8). Por lo tanto, en este sistema, el aumento de la activación del biosensor condujo a la disminución de las relaciones BRET. Dada la relación inversamente proporcional entre la activación del biosensor y los “ratios” BRET, se implementó arbitrariamente el índice BRET (iBRET) para obtener datos que reflejaran la proporcionalidad directa entre las señales BRET y la activación del biosensor, reportando el producto de la siguiente ecuación $BRET_{(0)}/BRET_{(x)}$, donde el índice BRET detectado a 0 ng de plásmido receptor se divide entre el índice BRET obtenido a x ng del plásmido del receptor.

5.10. Inmunocitoquímica

Antes de la transfección, células HEK293 se cultivaron sobre cubreobjetos tratados con medios provenientes del mismo tipo celular. Después de 48 de transfección, las células se fijaron con PFA al 4% durante 15 minutos en agua-hielo, posteriormente se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1% en PBS durante 10 minutos y se incubaron con una solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. El citoesqueleto de vimentina se detectó con el anticuerpo monoclonal V9 (que reconoce los residuos 411-423 del carboxilo terminal) durante 2 horas a temperatura ambiente en una cámara húmeda, seguida de la adición de un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a Alexa 633 (proporción 1:250 en solución de bloqueo). La tinción de F-actina se realizó simultáneamente con rodamina-faloidina (proporción 1:200 en solución de bloqueo con 1% de BSA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, los núcleos celulares se tiñeron con 300 nM de DAPI durante 5 minutos. Las imágenes se capturaron con el objetivo de inmersión 100X (apertura numérica [AN]: 1,3) del microscopio confocal Leica SP8 (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania) con 0.4 μ m entre cada corte y se procesaron con el software LAS AF Lite.

5.11. Ensayos de cierre de herida

Antes de la transfección, células HEK293 fueron cultivadas en pocillos pretratados con una solución de gelatina bovina al 0.2 % disuelta en PBS. Tras 40 h de transfección, las células se incubaron en una solución de ayuno durante 4 h. La proliferación celular se inhibió mediante una incubación de 2 h con mitomicina [4 µg/ml] previo a realizar la herida en la monocapa celular con una punta de micropipeta universal de 10 µl. Los pocillos se lavaron con PBS para eliminar los restos celulares y los medios se sustituyeron por medio DMEM suplementado con un 1% de SFB, 1000 U ml⁻¹ de penicilina-estreptomicina y 2 mM de GlutaMAX. El análisis se realizó capturando imágenes cada 12 h a través de un objetivo de 10X (apertura numérica [AN]: 0,25) de un microscopio invertido modelo DM IL HC LED para luz transmitida de campo claro y fluorescencia (LEICA). Los cálculos de fluorescencia y del área de la herida se realizaron con Fiji-ImageJ.

5.12. Ensayos de motilidad celular 2D por microscopía de “time-lapse”

3.6 X 10⁵ células HEK293 que fueron transfectadas con las variantes Lphn3 fusionadas a mVenus, se transfirieron a placas de fondo de cristal de 35 mm (pretratadas con medios provenientes de cultivos de células HEK293) y se cultivaron hasta su análisis por microscopía confocal de “time-lapse”. La adquisición de imágenes de células vivas se realizó 45 h posteriores a la transfección con el microscopio confocal Nikon ECLIPSE Ti conservando las condiciones iniciales del cultivo celular y manteniendo los siguientes parámetros: la captura de las imágenes se realizó con un objetivo de 20X (apertura numérica [AN]:0.45), 3.5 µm de espacio entre cada corte, por intervalos de 5 o 10 min durante 1 o 3 h (Lphn3 con Flrt3^{ECD}-Fc) (Excitación 475 nm, emisión 509 nm). Para los ensayos que implicaron la adición del ligando Flrt3^{ECD}-Fc [10 nM], la adquisición de imágenes se inició 1 h antes de añadir el ligando y se reanudó durante 2 h adicionales. Las imágenes se procesaron con Fiji-ImageJ a través del plug-in Manual Tracking utilizando la herramienta de corrección de centring para controlar las trayectorias celulares. Los parámetros de calibración del programa fueron los siguientes: intervalo de tiempo= 10 min, calibración x/y= 0,62 µm. Posteriormente, se analizaron los datos mediante el programa de chemotaxis para obtener los valores de la velocidad celular, así como

distancias acumuladas y euclidianas. Las trayectorias se ajustaron al punto de intersección de los ejes x e y y se trazaron en gráficos de trayectorias 2D. La distancia acumulada representó la trayectoria total de la célula, mientras que la distancia euclidiana, fue la distancia en línea recta entre el punto de origen y el punto final. La velocidad de la célula se definió como la distancia recorrida durante un periodo de tiempo determinado.

5.13. Análisis de imágenes

Para el análisis de los parámetros de dimensión celular y nuclear, la cuantificación de las estructuras de F-actina y la colocalización entre F-actina y las variantes de Lphn3 acopladas a mVenus se utilizaron imágenes de proyección máxima. Los datos de dimensión celular y nuclear se obtuvieron manualmente utilizando la herramienta poligonal del software de Leica (Leica LAS AF Lite 3.3.10134.0). Los filopodios, lamellipodios y blebs se identificaron manualmente según los criterios descritos por [49]. Brevemente, los Filopodios fueron definidos como protuberancias en forma de varilla que se originaron en la membrana celular y llenas de F-actina cortical; lamellipodios, como protuberancias anchas y laminares de la membrana celular con una magnitud de más de $6 \mu\text{m}$ y con F-actina cortical en su periferia; blebs, como protuberancias redondas con una base de menos de $2 \mu\text{m}$ y que puede o no contener F-actina cortical en su borde. Las poblaciones celulares analizadas fueron las siguientes: Ctrl $n=30$, Lphn3-WT^{mVenus} $n=38$, K561N^{mVenus} $n=39$, A760G^{mVenus} $n=33$, D798H^{mVenus} $n=34$, S810L^{mVenus} $n=31$, E811Q^{mVenus} $n=32$. La circularidad nuclear se calculó de acuerdo a lo publicado por [92] de la siguiente manera: $\text{circularidad nuclear} = 4\pi (\text{área}) / (\text{perímetro})^2$. Por lo tanto, valores cercanos a uno indicaron una alta circularidad.

Las estructuras de vimentina se clasificaron e identificaron manualmente como se reportó previamente [93]. Las estructuras en forma de anillo describieron los filamentos de vimentina que rodearon el núcleo y formaron deformaciones nucleares, mientras que las estructuras en forma de nudo se caracterizaron por la ausencia de vimentina filamentosa y por adoptar una forma más redonda cercana al núcleo. El índice de deformación se obtuvo dividiendo la suma de las áreas cóncavas nucleares sobre el área total del núcleo [94] utilizando la herramienta poligonal del software de Leica (Leica LAS AF Lite 3.3.10134.0). Por lo tanto, radios con valores altos representaron núcleos más deformados.

Las poblaciones celulares analizadas fueron las siguientes: Ctrl n=29, Lphn3-WT^{mVenus} n=36, K561N^{mVenus} n=33, A760G^{mVenus} n=30, D798H^{mVenus} n=31, S810L^{mVenus} n=29, E811Q^{mVenus} n=29.

5.14. Análisis estadístico

Los datos se expresaron como el error estándar de la media (S.E.M.) de al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism versión 6.0 utilizando ANOVA de una vía, ANOVA de dos vías o prueba “t” no apareada seguida de una prueba de Dunnett o de Tukey. Los valores *p* se indicaron en las leyendas de las figuras.

6. Resultados

6.1. Caracterización de los efectos de las variantes K⁵⁶¹N, A⁷⁶⁰G, D⁷⁹⁸H, S⁸¹⁰L y E⁸¹¹Q en la formación de complejos de adhesión entre Lphn3 y sus ligandos Teneurina 2 y Flrt3

La adhesión intercelular es una de las funciones celulares que caracterizan a la Lphn3. A través de sus dominios de tipo adhesión presentes en su NTF, Lphn3 puede mantener interacciones heterofílicas con sus ligandos endógenos para formar complejos de adhesión. Por lo tanto, se investigó el impacto de las mutaciones presentes en el dominio GAIN sobre las propiedades adhesivas intercelulares de Lphn3 con sus ligandos transmembranales Flrt3 y Teneurina 2. Para llevar a cabo dicho propósito se evaluó la formación de contactos célula-célula mediante la realización de ensayos de agregación celular, que consistieron en mezclar células que expresaron cada una de las variantes de Lphn3 (Fig. 11) con células que expresaron Flrt3 o Teneurina 2; de tal manera que, uniones proteína-proteína estables favorecerían la formación de agregados celulares, mientras que interacciones débiles o inexistentes darían lugar a un patrón de células dispersas (Fig. 12A-M). De manera simultánea, se realizaron coexpresiones de proteínas fluorescentes para diferenciar a cada población celular: EGFP para las células que expresaron las variantes de Lphn3, y DsRed para las que expresaron a los ligandos, permitiendo de esta manera visualizar a las células por microscopía de epifluorescencia. La condición control que únicamente expresó a las proteínas fluorescentes (es decir que no expresaba al receptor ni al ligando) mostró un patrón de células dispersas en todos los campos analizados. Este comportamiento contrastó

con aquellas células que expresaron a Lphn3WT, y que fueron incubadas con células que expresaron Flrt3 o Teneurina 2. En donde se observó la formación de grandes agregados celulares. De manera interesante, las variantes A⁷⁶⁰G, D⁷⁹⁸H y S⁸¹⁰L de Lphn3 disminuyeron las propiedades de adhesión intercelular únicamente con el ligando Flrt3, pero no con Teneurina 2 (Fig. 12N, O). Así, estos resultados nos condujeron a investigar si la disminución de la adhesión estaba relacionada con una pérdida de la unión de las variantes de Lphn3 con Flrt3. Para ello, las interacciones Lphn3-Flrt3 fueron evaluadas a través de ensayos de marcaje de superficie celular que consistieron en incubar a las células que expresaron las diferentes variantes de Lphn3 con Flrt3 soluble; es decir, desprovisto de su dominio transmembranal y acoplado a IgG-Fc (Flrt3^{ECD}-Fc) para después inmunodetectar el ligando unido a la membrana (Fig. 13) (Purificación de Flrt3^{ECD}-Fc Fig. S2). La señal fluorescente tanto de Lphn3WT como de las mutantes se detectó únicamente en la membrana celular, y así mismo la señal correspondiente a Flrt3^{ECD}-Fc fue detectada únicamente en la superficie de células que expresaron al receptor Lphn3 o sus variantes (Fig. S1). Estos hallazgos sugieren que las mutaciones del dominio GAIN no inhibieron las interacciones ligando-receptor, por lo que en conjunto estos resultados apuntan a que otros factores que afectan preferencialmente los contactos establecidos con Flrt3, podrían estar implicados en la adhesión intercelular modulada por Lphn3.

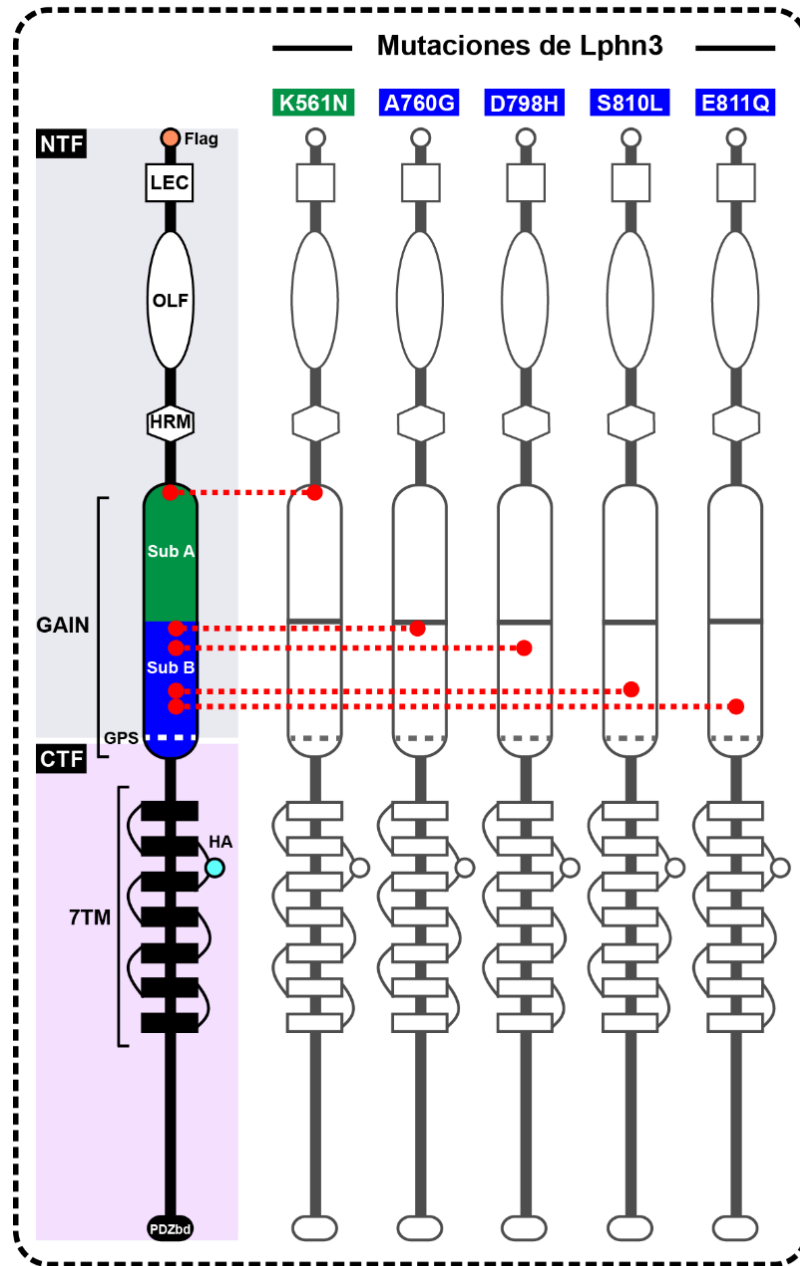


Figura 11. Representación esquemática de la organización de los dominios de Lphn3. La imagen muestra las mutaciones del dominio GAIN (K⁵⁶¹N, A⁷⁶⁰G, D⁷⁹⁸H, S⁸¹⁰L y E⁸¹¹Q), la etiqueta Flag fusionada al NTF y la etiqueta de hemaglutinina (HA) introducida en la primera asa extracelular. Leyendas de los dominios: lectina (LEC), olfactomedina (OLF), dominio de unión a hormona (HRM), sitio de proteólisis de GPCR (GPS), siete dominios transmembranales (7TM), dominio de unión a PDZ (PDZbd).

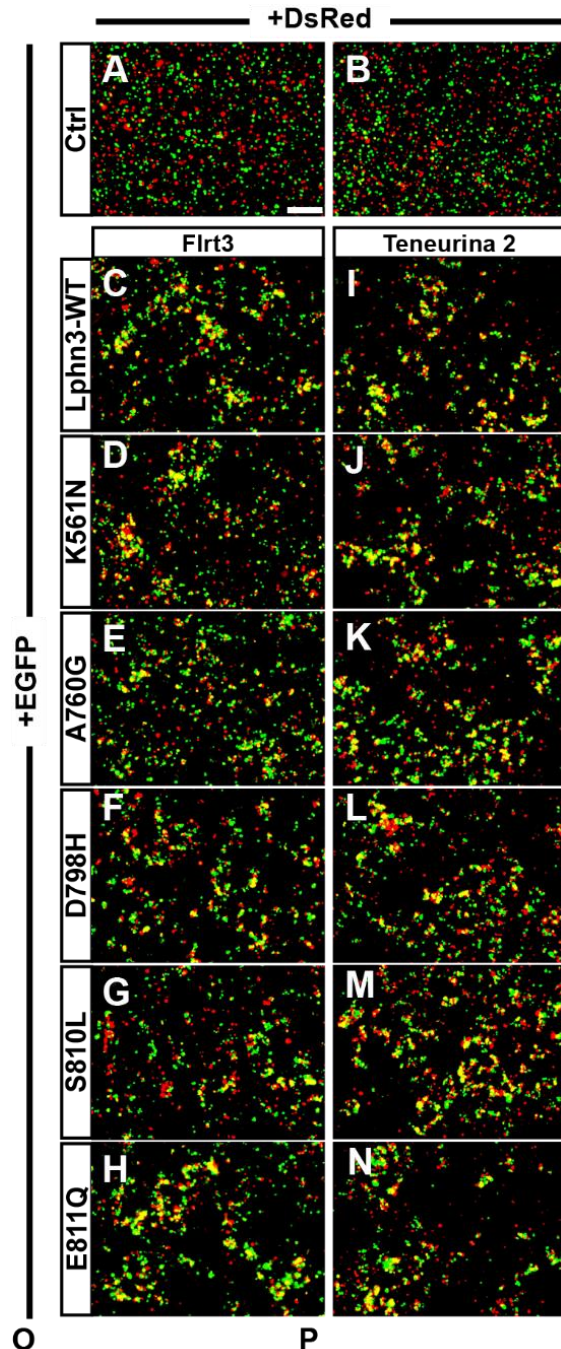
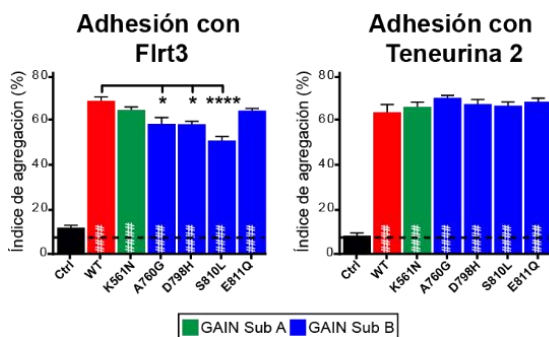


Figura 12. Las mutaciones en el dominio GAIN de Lphn3 relacionadas con cáncer, alteraron diferencialmente la adhesión intercelular con sus ligandos Flrt3 y Teneurina 2. (A-B) Imágenes representativas de microscopía de epifluorescencia de ensayos de agregación de la condición control o (C-N) en combinación con EGFP para Lphn3-WT y sus variantes junto con (C-H) células que coexpresaron DsRed y Flrt3 o (I-N) Teneurina 2. (O, P) Cuantificación del índice de agregación calculado a partir de ensayos realizados entre células que expresaron Lphn3 y células que expresaron Flrt3 o Teneurina 2, respectivamente. Barra de escala: 50 μ m. Subdominio A (GAIN Sub A) y B (GAIN Sub B) del dominio GAIN. Los datos representan la media de tres experimentos independientes (n = 3). La línea negra punteada representa los valores obtenidos en condiciones control (Ctrl). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía. Las barras de error indican la S.E.M., los valores *p* entre las variantes de Lphn3 y el control se indican con un #, mientras que los valores *p* entre las variantes de Lphn3 y Lphn3-WT se indican con un *. ##### o ***** $p \leq 0,0001$, #o* $p \leq 0,05$.



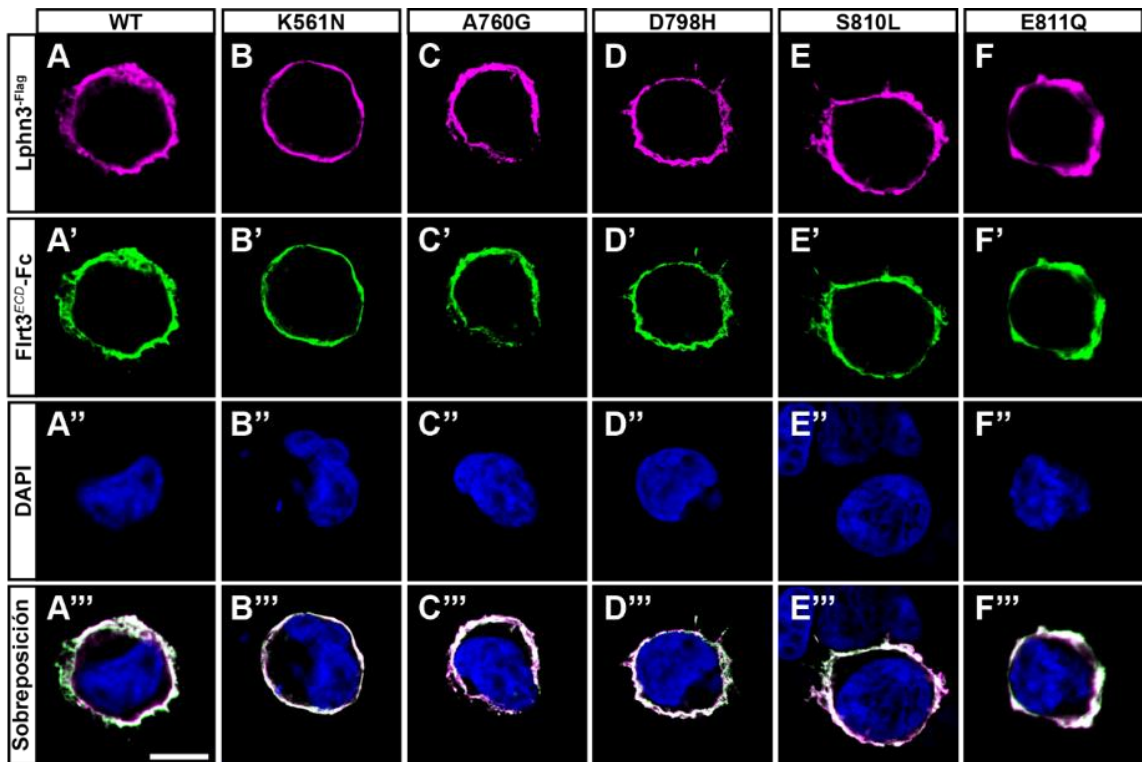


Figura 13. Las mutaciones en el dominio GAIN no impiden la unión de Lphn3 con Flrt3. Imágenes representativas de células HEK293 transfectadas con Lphn3 o sus variantes que fueron incubadas con Flrt3^{ECD}-Fc. Las células se visualizaron mediante microscopía confocal utilizando (A-F) un anticuerpo anti-Flag (señal fluorescente roja del anticuerpo secundario acoplado a Alexa 633, representado con el pseudocolor magenta) que reconoció el N-terminal de Lphn3, (A'-F') un anticuerpo anti-IgG humano (señal fluorescente verde del anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488) que reconoció el Flrt3^{ECD}-Fc unido a la superficie, (A''-F'') y DAPI para la tinción de los núcleos. (A'''-F''') Sobreposición de las imágenes. Barra de escala: 10 µm.

6.2. Las mutaciones en el dominio GAIN relacionadas con cáncer no alteraron la eficiencia de autoproteólisis del GPS ni la expresión de Lphn3 en la membrana

La ubicación de las mutaciones en ambos subdominios del dominio GAIN de Lphn3, nos llevó a cuestionarnos si las mutaciones presentes en el subdominio A (K⁵⁶¹N) respecto al subdominio B (A⁷⁶⁰G, D⁷⁹⁸H, S⁸¹⁰L y E⁸¹¹Q) tendrían efectos diferenciales sobre la autoproteólisis en el sitio GPS. Para ello, se analizaron los lisados totales de células HEK293 que expresaron Lphn3^{WT} o sus variantes mediante western blot, detectando el fragmento NTF a través del epítipo Flag (fusionado al dominio Lectina) y el fragmento CTF a través de la etiqueta Hemaglutinina (insertada en el primer bucle extracelular) (Fig. 14A). La cuantificación de las intensidades de fluorescencia reveló valores similares en los niveles del NTF y el CTF para todas las variantes al compararse con el receptor

silvestre; esto sugirió, que la producción de fragmentos generados por el corte del GPS no fue alterada por las mutaciones del dominio GAIN (Fig. 14B, C). Además, la eficiencia de corte fue evaluada a través de la relación NTF/CTF, la cual tampoco estuvo afectada por la presencia de las mutaciones en el GAIN en comparación con Lphn3WT (Fig. 14D). Con el fin de monitorear su correcto plegamiento y tráfico a la membrana, que es en donde los aGPCRs ejercen la mayoría de sus funciones, se realizó la inmunodetección del epítipo Flag (presente en la región extracelular de Lphn3) de células no permeabilizadas y transfectadas con las diferentes variantes de Lphn3. La cuantificación de las señales indicó que todas las variantes del receptor alcanzaron valores similares comparado con células que expresaron Lphn3WT, indicando una expresión similar al receptor silvestre en la superficie celular (Fig. 14E).

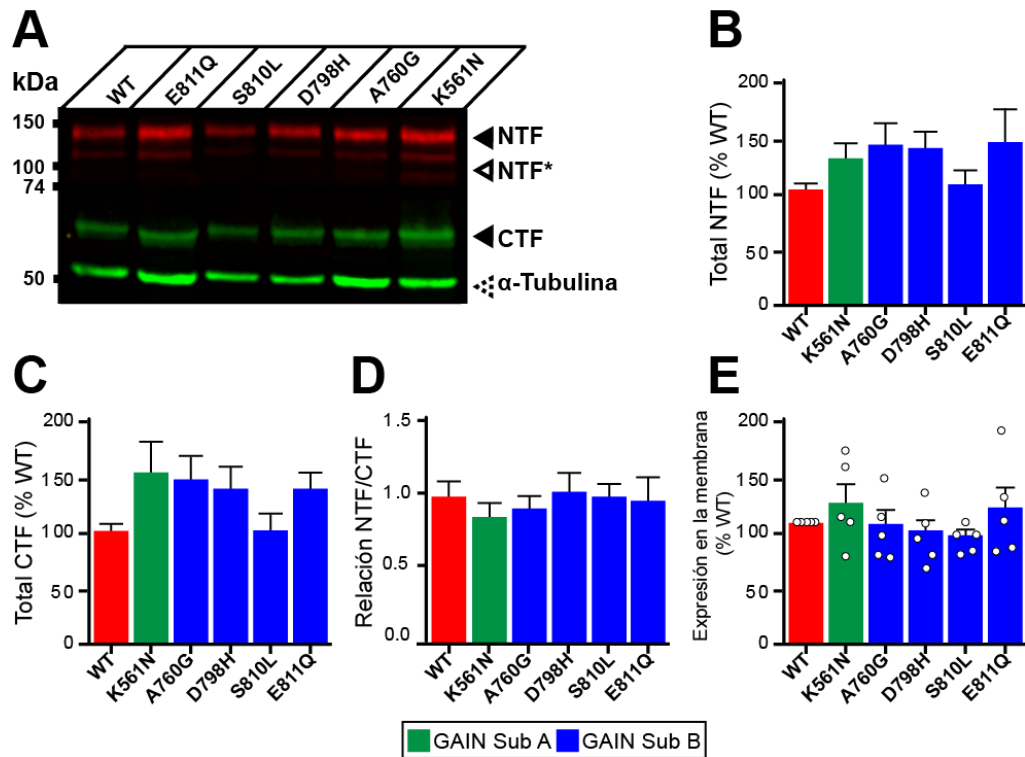


Figura 14. La expresión y autoproteólisis de Lphn3 no son alteradas por la presencia de las mutaciones en el dominio GAIN asociadas a cáncer. (A) Inmunoblot por fluorescencia de lisados totales de células HEK293 transfectadas con las variantes de Lphn3. El NTF se detectó con un anticuerpo anti-Flag de conejo y el CTF con un anticuerpo anti-HA de ratón. NTF* representa fragmentos resultantes de modificaciones postraduccionales desconocidas. La inmunodetección de α -tubulina se utilizó como control de carga. (B, C) Cuantificación de las señales fluorescentes obtenidas en (A) para NTF y CTF respectivamente. (D) Cuantificación de la eficiencia de corte

expresada como una relación NTF/CTF. Los datos de B-D corresponden a la media de al menos cuatro experimentos independientes con barras de error que representan la S.E.M., (n = 4). (E) Detección de la expresión de Lphn3 y sus variantes en la membrana celular. Se realizaron al menos cinco experimentos independientes por quintuplicado, la media de las cinco réplicas de cada condición se representó con los círculos blancos. Subdominio A (GAIN Sub A) y B (GAIN Sub B) del dominio GAIN. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una sola vía. Los datos se normalizaron con respecto a Lphn3WT y se representaron como la media de al menos cinco experimentos independientes con cuatro réplicas, cada uno de ellos con barras de error que representan la S.E.M., (n = 5).

6.3. La señalización a través de la activación de la proteína G α 13 inducida por el estado constitutivo de Lphn3, es disminuida por la presencia de las mutaciones relacionadas con cáncer en el dominio GAIN

En su estado basal o constitutivo, Lphn3 es capaz de activar cascadas de señalización a través de su acoplamiento a diferentes familias de proteínas G, especialmente a la familia G α 13. Es bien conocido que el dominio GAIN de Lphn3 encipta un ligando anclado que puede interactuar con las regiones transmembranales del CTF y modular la activación al receptor. Por lo tanto, nos interesó investigar si las mutaciones en el dominio GAIN podían desestabilizar intrínsecamente su conformación que llevara a defectos en su capacidad inductora de actividad hacia el acoplamiento de la proteína G α 13. La activación de la vía G α 13 fue monitoreada a través de un biosensor basado en la transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) que depende de la cercanía (menor a 10 nm) entre una molécula donadora y una molécula aceptora. La molécula donadora de energía fue la luciferasa Rluc8 que estuvo fusionada a la subunidad G α 13, mientras que la molécula aceptora fue la proteína verde fluorescente GFP2 fusionada a la subunidad G γ 9. Con el propósito de evaluar la actividad constitutiva del receptor, se cotransfectaron células HEK293 usando cantidades crecientes de ADN plasmídico de las variantes de Lphn3 con cantidades constantes del ADN del biosensor, esto para promover gradualmente la formación de complejos receptor-proteína G (Fig. 15A). La cuantificación de las señales BRET2 y su conversión en iBRET evidenciaron una disminución o incremento, respectivamente, de la activación del biosensor G α 13 que fue dependiente de la concentración de ADN plasmídico, lo cual es un comportamiento característico de la actividad constitutiva (Fig. 15A, B). Así mismo, todas las variantes de Lphn3 mostraron una actividad constitutiva; sin embargo, las mutaciones K⁵⁶¹N, D⁷⁹⁸H, S⁸¹⁰L y E⁸¹¹Q

disminuyeron significativamente la eficiencia máxima de Lphn3 en el acoplamiento a la vía $G\alpha_{13}$. Únicamente la mutación A⁷⁶⁰G resultante de una sustitución de aminoácidos homólogos, no disminuyó significativamente la señalización de Lphn3 a través de $G\alpha_{13}$. Debido a que la vía $G\alpha_{13}$ puede modular la remodelación del citoesqueleto de actina, la deficiencia funcional observada por las variantes de Lphn3 sugiere que las alteraciones del dominio GAIN causadas por mutaciones somáticas dentro del gen Lphn3 pueden contribuir a deficiencias en la señalización celular vinculadas a defectos en la dinámica de actina durante el desarrollo de procesos patológicos como la carcinogénesis.

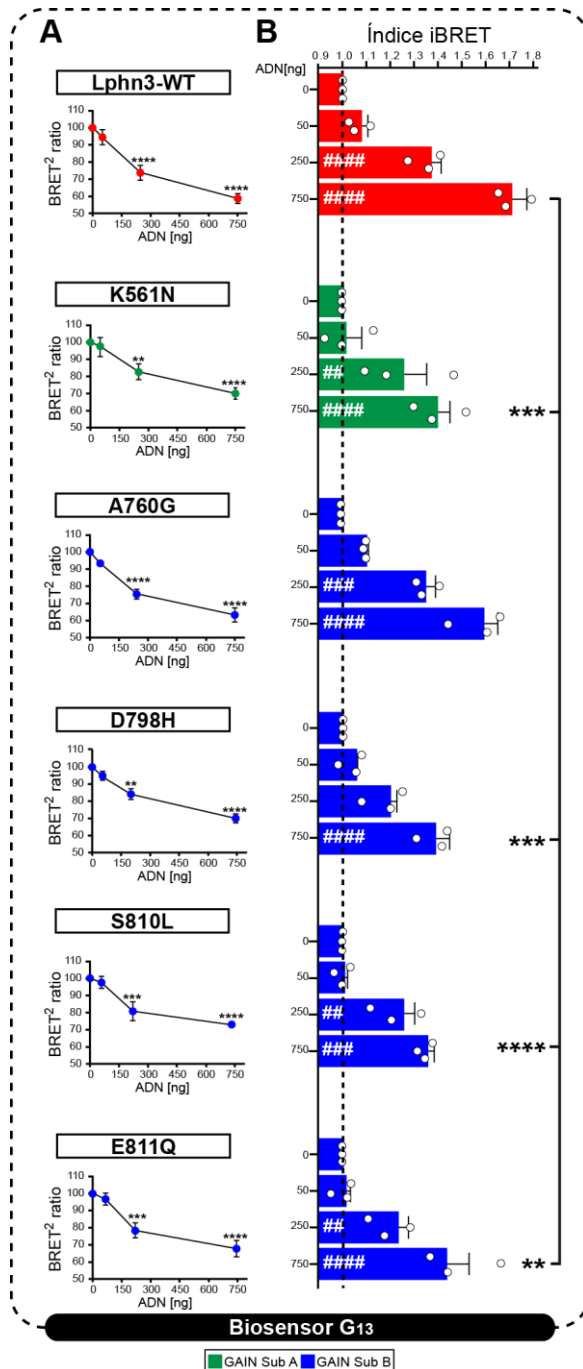


Figura 15. La señalización por $G\alpha_{13}$ fue disminuida por las mutantes $K^{561}N$, $D^{798}H$, $S^{810}L$ y $E^{811}Q$. La actividad constitutiva de Lphn3 fue evaluada con cantidades crecientes de plásmidos de las variantes de Lphn3 (0, 50, 250, 750 ng) y una concentración constante de plásmidos del biosensor $G\alpha_{13}$ (Rluc8-G13, G β 3, GFP2-GY9). (A) Gráficas que muestran el análisis del BRET2 ratio. La disminución de los valores indica un aumento de la actividad del biosensor $G\alpha_{13}$. Los valores de p describen la significancia entre los valores BRET2 ratio obtenidos a 0 ng y a una determinada concentración de plásmido del mismo receptor: **** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$. (B) Cálculo del índice iBRET, en donde su aumento corresponde a una mayor actividad del biosensor. Los círculos blancos representan la media de cuatro réplicas de cada experimento. Subdominio A (GAIN Sub A) y B (GAIN Sub B) del dominio GAIN. Los datos representan la media de al menos tres experimentos independientes ($n = 3$). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías. Las barras indican el S.E.M., los valores de p entre 0 ng de ADN (línea negra punteada) y cada concentración de ADN de la misma variante de Lphn3 se indican con #, mientras que los valores de p entre 750 ng de ADN de las variantes de Lphn3 y 750 ng de ADN de Lphn3WT se indican con *: #### $p \leq 0,0001$, ### $p \leq 0,001$, ## $p \leq 0,01$.

6.4. La inhibición de la formación de lamelipodios inducida por Lphn3 es alterada en células que expresaron a la variante S⁸¹⁰L relacionada con cáncer

El citoesqueleto de actina es un elemento crucial en la adhesión celular ya que regula el ensamblaje y mantenimiento de las uniones intercelulares a través de su unión con moléculas de adhesión localizadas en la membrana celular. Estudios previos han evidenciado que la expresión de Lphn3 en células HEK293 induce cambios en la remodelación del citoesqueleto, que afectan la formación de estructuras dependientes de actina e impactan severamente la morfología celular y nuclear. Aún no se conocen con exactitud los mecanismos orquestados por Lphn3 y que son responsables de dichos cambios; sin embargo, se sabe que pueden ser tanto dependientes como independientes de la activación de proteínas G, siendo el NTF una región importante de la Lphn3 para regular cambios en el tamaño de las células y sus núcleos. Por tal motivo, nos interesó investigar el impacto de las mutaciones relacionadas con cáncer presentes en el GAIN del NTF de la Lphn3 sobre la morfología celular y nuclear, así como también sobre la formación de estructuras dependientes de actina relacionadas con la migración celular. Con el propósito de diferenciar a las células transfectadas que expresan o no a los receptores, se fusionó la proteína fluorescente mVenus al CTF de la Lphn3 o de sus variantes (Fig. 16). Los núcleos fueron teñidos con DAPI y para visualizar el contenido de actina filamentosa (F-actina), así como la delimitación de la membrana plasmática celular a través de la detección de actina cortical, las células se tiñeron con faloidina-rodamina (Fig. 17A-G). El análisis de las imágenes por microscopía confocal confirmó la detección de Lphn3WT en la membrana celular, que coincidió con la señal de actina cortical (Fig. 17A"-G", Q) junto con la disminución de las dimensiones de área y perímetro celular/nuclear, aumento de la circularidad nuclear, inhibición de la formación de lamelipodios y la inducción de blebs, cuyas estructuras no forman parte del fenotipo de células control transfectadas con mVenus (Fig. 17H-P). Las variantes de Lphn3 imitaron las mismas modificaciones celulares inducidas por Lphn3WT, con excepción de las células que expresaron la mutante S⁸¹⁰L, las cuales mostraron un incremento significativo en la formación de lamelipodios comparado con el receptor silvestre. Puesto que la formación de lamelipodios depende de una retroalimentación positiva entre las adhesiones basadas en integrinas y la actividad de Rac1, así como de una interacción independiente de GPCRs entre Rac1 y G α 13, estos

resultados sugieren que están involucrados mecanismos independientes a $G\alpha_{13}$, teniendo en cuenta que solo la mutante $S^{810}L$ mostró este fenotipo de mayor adherencia a la matriz respecto a las demás variantes de Lphn3 que también mostraron deficiencias para señalar por $G\alpha_{13}$.

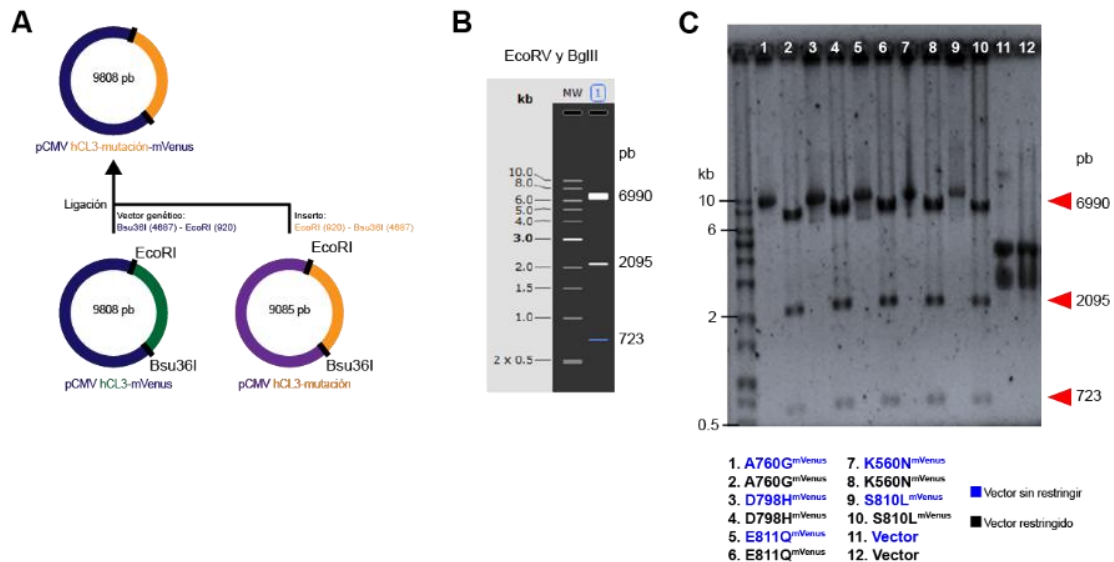


Figura 16. Estrategia de clonación para la fusión de mVenus a las variantes de Lphn3. (A) El esquema representa los pasos generales que se siguieron para insertar la secuencia codificante de cada variante de Lphn3 (naranja) al plásmido molde que contenía la secuencia para mVenus (azul). Las secuencias de Lphn3WT y las variantes fueron extraídas a través del corte específico de las endonucleasas EcoRI y Bsu36I. (B) Análisis *in silico* de las clonas de las variantes de Lphn3 fusionadas a mVenus a través de las endonucleasas EcoRV y BglII, en donde una clonación exitosa generaría tres fragmentos con tamaños relativos de 6990, 2095 y 723 pb. (C) Gel de agarosa que muestra el corrimiento de las clonas fusionadas a mVenus tratadas (negro) y no tratadas (azul) con las endonucleasas EcoRV y BglII. Las cabezas de flecha indican los tamaños relativos esperados que coincidieron con el análisis *in silico* en (B).

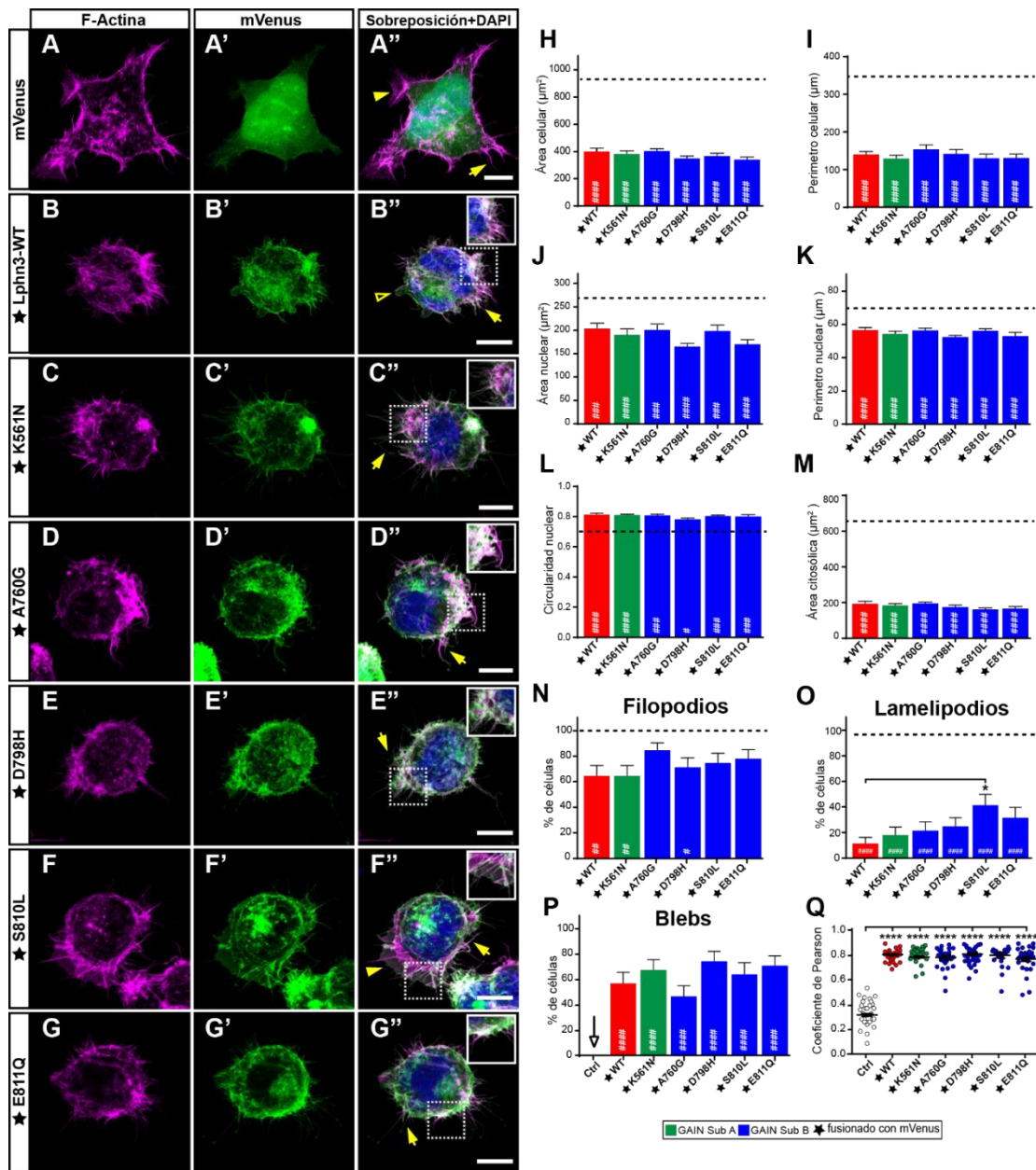


Figura 17. La mutación S⁸¹⁰L altera la remodelación del citoesqueleto de actina inducido por Lphn3. Imágenes representativas de microscopía confocal de células HEK293 que expresaron (A'-G') mVenus (Ctrl) o las variantes de Lphn3 marcadas con mVenus (verde), para las cuales (A-G) la F-actina se tiñó con faloidina-rodamina (magenta) y (A''-G'') con DAPI para los núcleos (azul). Los píxeles blancos en las imágenes del recuadro representan la colocalización de F-actina con el receptor. Las estructuras de actina son indicadas como sigue: filopodios (flecha), lamelipodios (punta de flecha) y blebs (punta de flecha vacía). Barra de escala: 10 µm. (H-M) Cuantificación de las diferentes dimensiones celulares y nucleares. (N-P) Cuantificación de las estructuras dependientes de actina. La línea punteada representa los valores obtenidos para las células control que expresaron únicamente a mVenus. (Q) Gráfico de dispersión que representa los píxeles

sobrelapados entre la señal de F-actina y la fluorescencia emitida por las variantes de Lphn3 fusionadas con mVenus. Subdominio A (GAIN Sub A) y B (GAIN Sub B) del dominio GAIN. Las construcciones de los receptores marcados con mVenus se indican con una estrella (★). Los datos representan la media de al menos tres experimentos independientes (n = 3). Se analizaron al menos 30 células por cada condición. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía. Las barras de error indican el S.E.M., los valores de p entre las variantes de Lphn3 marcadas con mVenus y los datos del control se indican con #, mientras que los valores de p entre las variantes de Lphn3 marcadas con mVenus y Lphn3WT se indican con *: ##### $p \leq 0,0001$, ### $p \leq 0,001$, ## $p \leq 0,01$, #° * $p \leq 0,05$.

6.5. La expresión de Lphn3 modifica la remodelación del citoesqueleto de vimentina promoviendo cambios en la forma nuclear, los cuales son atenuados por la presencia de las mutaciones S⁸¹⁰L y E⁸¹¹Q

Durante el análisis morfológico relacionado con el citoesqueleto de actina, llamo la atención la presencia de malformaciones en los núcleos de células que expresaron Lphn3, presentando lobulaciones intercaladas por invaginaciones cuya naturaleza no fue clara al inicio (Fig. 18A-G y Fig. 19A-G). Cuando se compararon los núcleos de las células que expresaron Lphn3 con los núcleos de células control, fue evidente que las deformaciones nucleares fueron hasta cinco veces más frecuentes en las primeras que en las segundas (Fig. 18H). El análisis de la relación de las áreas generadas por las invaginaciones respecto al área total del núcleo, reveló que la expresión de las mutaciones S⁸¹⁰L y E⁸¹¹Q disminuyó significativamente la presencia de estas deformaciones nucleares en comparación con la expresión de Lphn3WT (Fig. 18H).

La vimentina es un tipo de filamento intermedio que es considerado como marcador de la transición epitelio mesénquima durante la carcinogénesis y que otorga cierta protección a la célula del estrés mecánico producido por procesos como la migración celular. Debido a la evidencia que existe sobre la relación entre la vimentina y la morfología nuclear, nos interesó visualizar la distribución de la vimentina endógena en células que expresaron Lphn3 a través de inmunofluorescencia indirecta por microscopía confocal. Las células control expresando únicamente mVenus mostraron una distribución del citoesqueleto de vimentina que abarcó la región perinuclear y el área citoplasmática organizada en una extensa red de filamentos (Fig. 18A). Esta distribución contrastó fuertemente con la mostrada por las células que expresaron Lphn3, en las que la vimentina formó estructuras enredadas y compactas en forma de nudo, adyacentes al núcleo y/o formando anillos que

rodearon las lobulaciones nucleares (Fig. 18B, Fig. 19A-G). Los cambios en el citoesqueleto de vimentina inducidos por las variantes del receptor fueron similares a los observados en células que expresaron a Lphn3WT (Fig. 18C-G). Para evidenciar la distribución compacta del citoesqueleto de vimentina se analizó la relación del área que ocupaba dentro de la célula respecto al área total de la misma; este análisis reveló valores de dispersión más bajos para las células que expresaron Lphn3, que para las células control, indicando que la mera reducción del área celular resultado de la expresión del receptor no explica por sí misma la alteración en la redistribución de la vimentina (Fig. 18J). Por su parte, para analizar la relación del citoesqueleto de vimentina con las malformaciones del núcleo, se analizó el solapamiento de las señales de inmunofluorescencia de vimentina con las señales de DAPI/núcleo. Se observó que las áreas hendidas que dieron lugar a una morfología nuclear cóncava, coincidieron significativamente con la presencia de vimentina en células que expresaron Lphn3 comparado con células control, las cuales presentaron una frecuencia reducida de este fenotipo (Fig. 18A'-G', I). A pesar de que la presencia de estructuras condensadas de vimentina fue de 3 a 4 veces más frecuentes en células que expresaron Lphn3 respecto a células del control, no pudimos detectar diferencias en la prevalencia de esta organización de vimentina entre Lphn3WT y sus variantes (Fig. 18K-M).

La inmunodetección de vimentina endógena a partir de lisados celulares totales apoyó los hallazgos observados por microscopia confocal, ya que reveló la presencia de dos estados de vimentina: un estado intacto de 57 kDa y un producto de menor tamaño que migró como una banda de 47 kDa, similar a los fragmentos de vimentina generados por proteasas (Fig. 18N). El análisis de la relación de ambos estados de vimentina mostró que las células control presentaron una mayor abundancia de vimentina intacta, mientras que las células que expresaron a Lphn3 presentaron un incremento del estado escindido, sin diferencias significativas en comparación con las variantes de Lphn3 (Fig. 18O). Dado el importante papel que desempeña el citoesqueleto de vimentina en la migración celular, estos resultados sugieren que la expresión de Lphn3 o de sus variantes asociadas con cáncer, podrían estar influenciando diferentes patrones de migración celular que contrastarían significativamente con el de las células que no expresan al receptor.

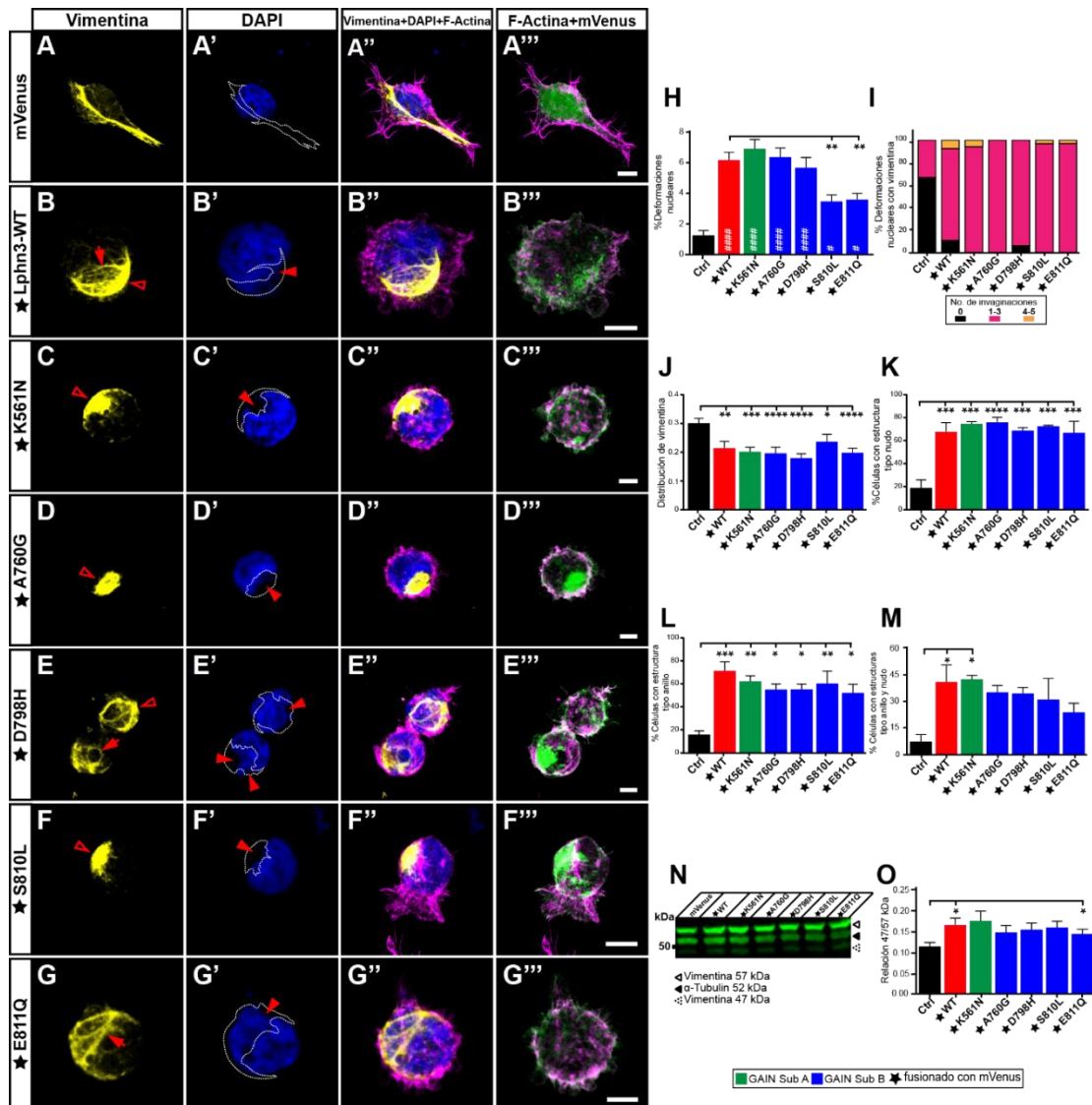


Figura 18. La remodelación de vimentina inducida por Lphn3 coincide con deformaciones nucleares que fueron disminuidas por las mutaciones S⁸¹⁰L y E⁸¹¹Q. Imágenes capturadas por microscopía confocal de células HEK293 que expresaron mVenus (Ctrl) o las diferentes variantes de Lphn3 acopladas a mVenus, en las que (A-G) se inmunodetectó el citoesqueleto de vimentina (amarillo) y se tiñeron (A'-G') los núcleos con DAPI (azul) y (A''-G'') F-actina (magenta). En A-G las estructuras tipo anillo de vimentina se representan con flechas, mientras que las estructuras tipo nudo están representadas por las puntas de flecha vacías. En (A'-G') las cabezas de flecha representan los sitios de deformación nuclear que coincidieron con el citoesqueleto de vimentina, representado con la línea punteada. (A'''-G''') Imágenes sobrepuestas de las señales de mVenus y F-actina. Barra de escala: 10 μ m. Al menos 30 células fueron analizadas por cada condición. (H) Análisis de la deformación nuclear calculado como el área de la deformación nuclear/área total nuclear. (I) Distribución que muestra el número de deformaciones nucleares que coincidieron con la señal del citoesqueleto de vimentina. (J) Distribución del área ocupada por la señal de vimentina (área de vimentina/área celular total). (K-M) Cuantificación de células que presentaron una o ambas estructuras tipo nudo y anillo del citoesqueleto de vimentina. (N) Western Blot de lisados

totales de células transfectadas con las construcciones de Lphn3. Se observó la presencia de dos bandas: vimentina completa (57 kDa) y vimentina cortada (47 kDa). La detección de α -tubulina se utilizó como control de carga de proteínas. (O) Datos de la relación de fluorescencia normalizada entre la señal de vimentina cortada sobre la señal de vimentina intacta (47/57 kDa). Subdominio A (GAIN Sub A) y B (GAIN Sub B) del dominio GAIN. Las construcciones de receptores acoplados a mVenus son indicados con una estrella (★). Los datos fueron representados como la media de al menos tres experimentos independientes ($n = 3$). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía y prueba *t*-student. Las barras de error indican el S.E.M., los valores de *p* entre las variantes de Lphn3 marcadas con mVenus y la condición control son indicados con #, los valores de *p* entre las variantes de Lphn3 marcadas con mVenus y Lphn3WT son indicados con *: ##### $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, # o * $p \leq 0,05$.

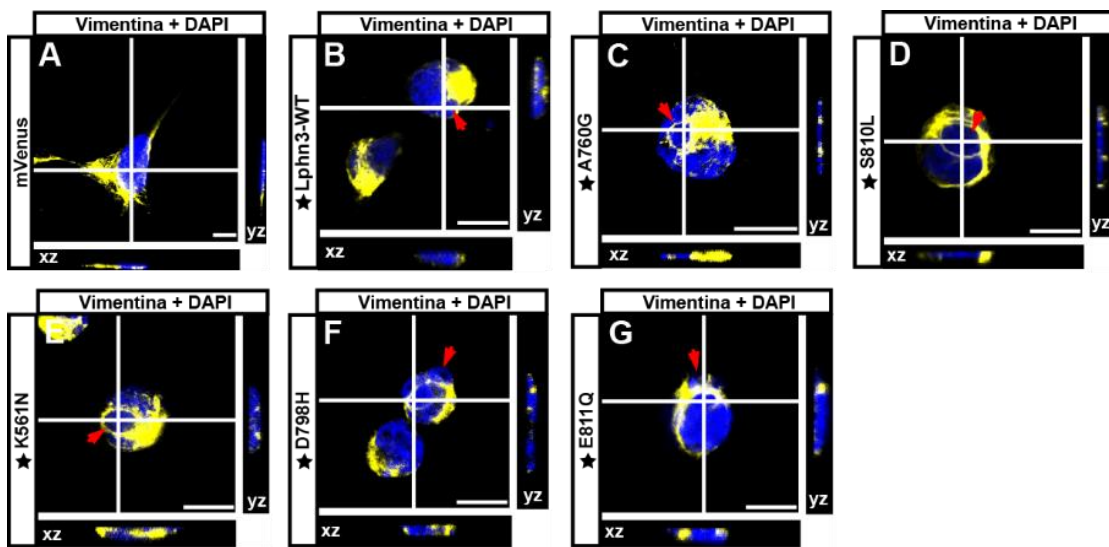


Figura 19. La reorganización del citoesqueleto de vimentina coincidió con las deformaciones nucleares en células que expresaron Lphn3. (A-G) Imágenes representativas en plano Z que muestran el citoesqueleto de vimentina (amarillo) y los núcleos (azul) de células HEK293 que expresaron Lphn3 o sus variantes fusionadas con mVenus. La vimentina se detectó utilizando un anticuerpo que reconoció su región carboxilo-terminal y se usó DAPI para teñir núcleos. Las células control fueron transfectadas únicamente con mVenus. Las líneas blancas en la imagen central indican los planos ortogonales de XZ (panel inferior) e YZ (panel derecho). Las flechas representan las lobulaciones nucleares que coincidieron con la presencia de estructuras circundantes tipo anillo de vimentina. Cabe destacar que los núcleos de las células control no estuvieron rodeados por las estructuras de vimentina. Se analizaron al menos 30 células por cada condición de tres experimentos independientes. Barra de escala: 10 μ m. Las construcciones de los receptores fusionados con mVenus son indicados con una estrella (★).

6.6. La presencia de Lphn3 o sus variantes asociadas a cáncer retardaron la migración celular polarizada

La migración celular es un proceso estrechamente relacionado con la forma de las células, la cual está determinada por la presencia de diferentes estructuras como: lamelipodios, filopodios o blebs, que van a influir en los patrones de migración celular. En cáncer, la dinámica entre diferentes tipos de migración es crucial para la metástasis, y dado que las células que expresaron Lphn3 o sus variantes mostraron un fenotipo deficiente en cuanto a la adhesión, que contrastó con el de las células del control, se investigó si estos cambios morfológicos tendrían un impacto en la migración celular. Se realizaron ensayos de cierre de herida para analizar el efecto de la expresión de Lphn3 en la migración colectiva de una población de células heterogénea (es decir, células que expresaron y que no expresaron Lphn3) en respuesta a factores de reparación producto del insulto generado en la monocapa celular. Las células transfectadas fueron tratadas con mitomicina-C para evitar la proliferación celular y la monocapa fue rayada con una punta de micropipeta para después monitorear la progresión de la migración por microscopía de campo claro y fluorescencia inmediatamente, después del insulto y hasta 48 h finales. El análisis de las imágenes capturadas por campo claro que corresponde a la población total (células transfectadas y no transfectadas), reveló que se alcanzó un cierre de la herida (~80%) casi completo para las muestras correspondientes al control positivo que se incubaron con SFB y que expresaron a mVenus (Fig. 20A, B). La incubación de las células control con Ig-Fc o Flrt3^{ECD}-Fc mostró un patrón de migración similar, presentando cierres de heridas en un 68% y 69%, respectivamente, (Fig. 20B). De manera interesante, las células transfectadas con Lphn3, no alcanzaron a cerrar la herida al nivel de la condición control, y este efecto fue independiente de su incubación con o sin el ligando Flrt3 (33% y 40% respectivamente). Las células que expresaron las construcciones de las mutantes del GAIN, imitaron el mismo patrón de cierre de la herida mostrado por las células transfectadas con Lphn3WT. El análisis particular de la población fluorescente (células transfectadas) que expresaron Lphn3, reveló que estas células permanecieron en los bordes de la herida, contrario a lo observado en las condiciones control que expresaron mVenus, las cuales se redistribuyeron entre el borde y el espacio de la herida (Fig. 20C). Estos resultados sugieren que Lphn3 y sus variantes ejercieron intrínsecamente una regulación

tanto autónoma como no autónoma de las células sobre la migración celular colectiva, que redujo su respuesta hacia estímulos relacionados con una migración polarizada.

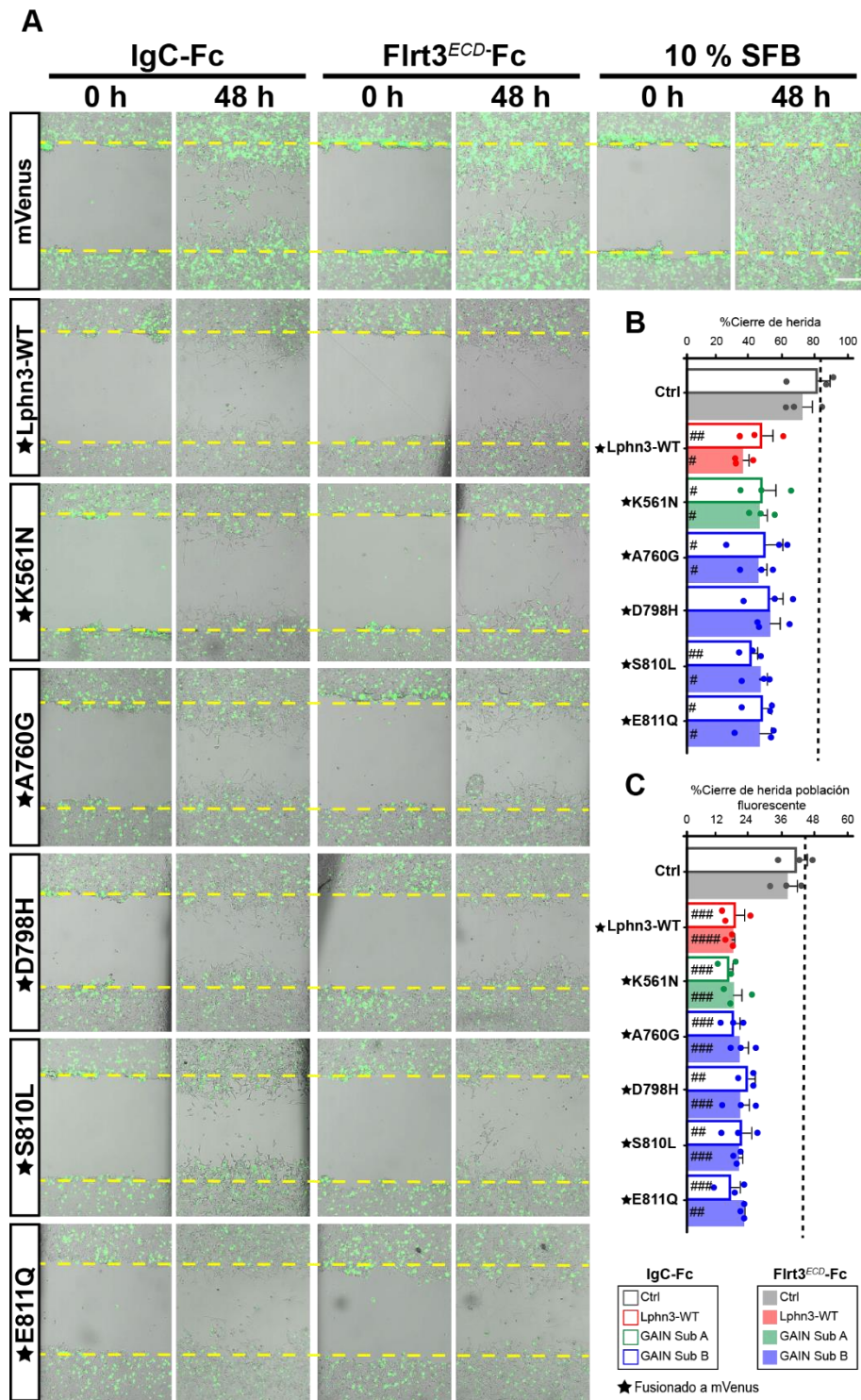


Figura 20. El efecto retardado de la migración polarizada inducido por Lphn3 no fue alterado por las mutaciones del dominio GAIN relacionadas con cáncer. (A) Sobreposición de imágenes representativas de microscopía de campo claro y epifluorescencia de células que expresaron Lphn3 acopladas a mVenus o únicamente mVenus capturadas al inicio (cero horas) y 48 h después de la herida de la monocapa celular en ausencia (IgC-Fc) y presencia del ligando

Flrt3^{ECD}-Fc. Las líneas punteadas amarillas representan los bordes de la herida a las cero horas. Las células incubadas con SFB al 10 % se utilizaron como control positivo de migración. Barra de escala: 200 μ m. (B) Calculo de los porcentajes de cierre de herida en presencia de IgC-Fc o Flrt3^{ECD}-Fc representados como el área ocupada por las células en la herida a las 48 h tomando en cuenta el área total generada por la herida a las cero horas. (C) Relación entre el área de fluorescencia ocupada por las células que expresaron la señal de mVenus en la herida (receptores marcados con mVenus o células de control) y el área total de fluorescencia en el campo analizado. La línea punteada representa los datos correspondientes a los valores del control positivo de migración. Subdominios A (GAIN Sub A) y B (GAIN Sub B) del dominio GAIN. Las construcciones de los receptores marcados con mVenus son indicados con una estrella (★). Los datos representan la media de al menos tres experimentos independientes (n = 3). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía. Las barras de error indican la S.E.M., los valores de *p* entre las variantes de Lphn3 marcadas con mVenus y los datos de la condición control son indicados con #. ##### *p* ≤ 0,0001, #### *p* ≤ 0,001, ## *p* ≤ 0,01, # *p* ≤ 0,05

6.7. La mutante S⁸¹⁰L del dominio GAIN asociada a cáncer inhibe la motilidad celular inducida por Lphn3

Las células cancerosas pueden transitar entre diferentes tipos de migración a través del cambio en el perfil de expresión de proteínas como las moléculas de adhesión. Por ejemplo, durante la transición endotelio mesénquima, se pierden contactos célula-célula lo que induce la propagación de células individuales a diferentes partes del organismo para potencialmente establecer tumores secundarios en otros tejidos. Tomando en cuenta los efectos inhibitorios de Lphn3 sobre la migración celular colectiva, se caracterizaron los efectos autónomos de Lphn3 sobre células individuales, a través de monitorear algunos parámetros de motilidad celular en imágenes de microscopía confocal capturadas por lapsos de tiempo (time-lapse) usando células HEK293. En un intento por primero discriminar comportamientos de motilidad dependientes de la activación del receptor, capturamos el movimiento de células individuales que expresaron al receptor en ausencia o presencia de su ligando agonista Flrt3. La velocidad del movimiento de células que expresaron Lphn3 mostró un incremento inmediatamente después de la adición de Flrt3 soluble en el medio celular (Fig. 21A-D). Sin embargo, este aumento de la velocidad fue transitorio, ya que las células alcanzaron niveles de velocidad similares a la condición sin Flrt3 al cabo de los siguientes 50 minutos después de la adición del ligando (Fig. 21E, F), sin mostrar diferencias significativas en la distancia acumulada y desplazamiento celular.

Por lo tanto, con esta información se pudo concluir que el aumento de la activación del receptor estuvo relacionado con el aumento transitorio de la velocidad celular.

A continuación, se caracterizó el efecto de la actividad constitutiva del receptor sobre la motilidad celular. Cuando se compararon las trayectorias de las células que expresaron Lphn3 respecto a las trayectorias de células control que expresaron mVenus, las primeras mostraron sistemáticamente un aumento de la distancia recorrida y, en consecuencia, una mayor velocidad, así como un cambio en el desplazamiento celular (distancia euclidiana) (Fig. 21G-I, K-M). Las células control que expresaron mVenus adoptaron un movimiento de tipo mesenquimal caracterizado por la presencia de lamelipodios, que contrastó con el de las células que expresaron Lphn3, las cuales mostraron una morfología redondeada durante todo el tiempo de análisis y ante la presencia de estructuras como blebs mostraron largos desplazamientos repentinos que impactaron las trayectorias y la velocidad. Frente a estas diferencias sobre las capacidades motiles inducidas por Lphn3WT, fue de interés el análisis de la participación del dominio GAIN en esta nueva función del receptor. De acuerdo al efecto en el mantenimiento de contactos con la matriz a través de estructuras como lamelipodios, y la deficiencia mostrada para señalizar por $G\alpha_{13}$, se escogió a la mutante $S^{810}L$ para investigar la participación del dominio GAIN en la motilidad dependiente de Lphn3. Sorpresivamente, la expresión de este receptor mutante dio lugar a valores de desplazamiento más bajos evidenciados por las trayectorias y velocidades que fueron similares a las células control (Fig. 21J, K-M). Por lo tanto, el efecto autónomo de la célula inducido por la expresión de la variante de Lphn3 con la mutación $S^{810}L$, correspondió a un fenotipo de pérdida de función que estuvo relacionado con un aumento de estructuras de actina que favorecieron la unión de la célula con la matriz y la disminución de la eficacia para señalizar a través de la proteína $G\alpha_{13}$, ambos contrastando con las funciones del receptor silvestre. Por lo tanto, estos resultados aportan evidencias sobre la importancia de la integridad del dominio GAIN de Lphn3 para modular procesos de motilidad celular.

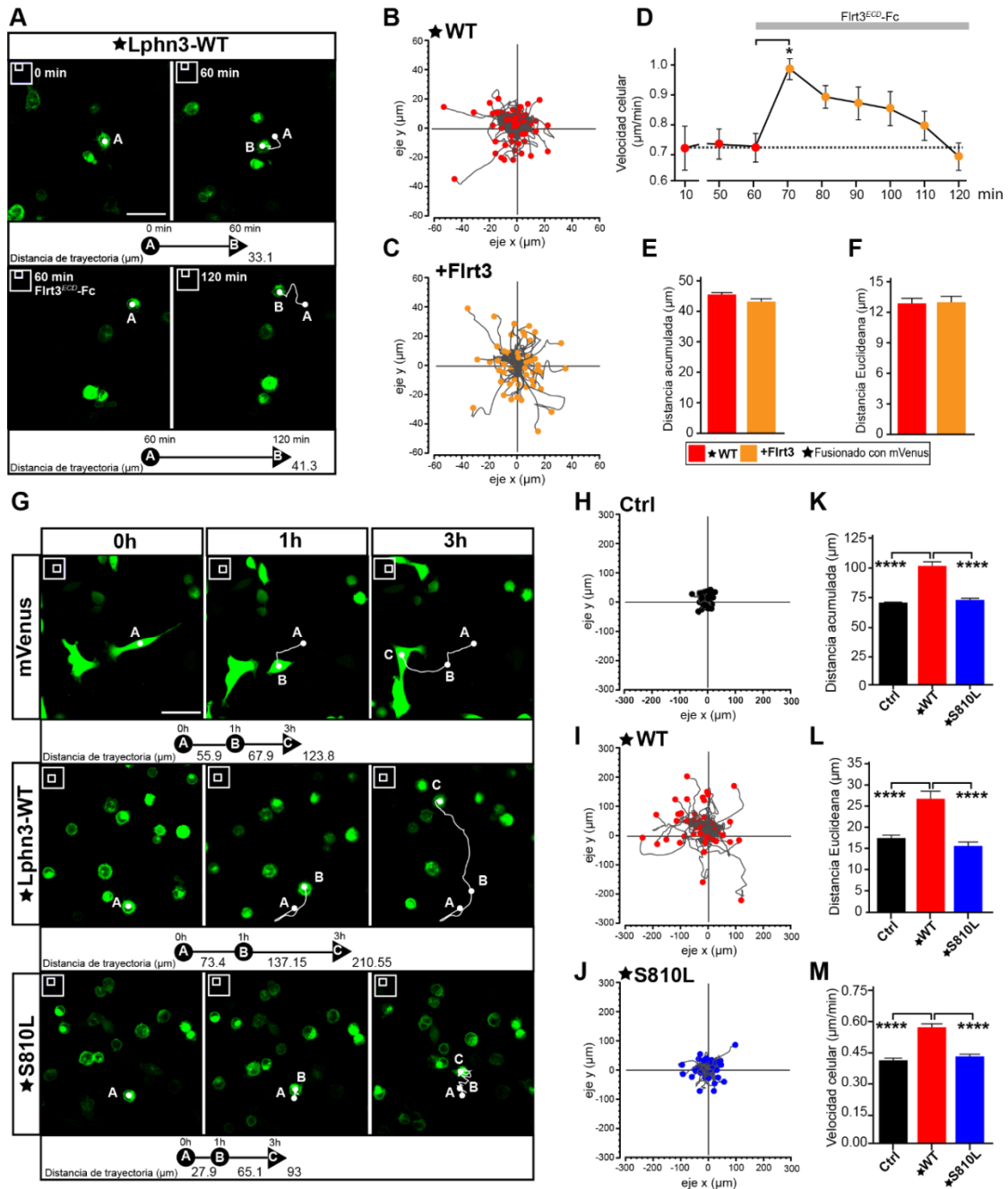


Figura 21. La motilidad celular inducida por la expresión de Lphn3 fue inhibida por la mutación S⁸¹⁰L presente en el dominio GAIN. (A) Imágenes representativas obtenidas por microscopía de lapsos de tiempo de 5 minutos de cultivos de células HEK293 de baja confluencia, que fueron transfectados con el plásmido codificante para Lphn3 asociado a mVenus; antes y después de la incubación con Flrt3^{ECD}-Fc. La posición temporal de las células capturadas en un plano 2D es indicado con los puntos blancos y las letras A y B. Las líneas blancas representan la trayectoria de las células. Barra de escala: 50 μm. (B, C) Diagramas de trayectoria que muestran el recorrido de las células individuales a lo largo de 1 h para las células analizadas en A. Las

trayectorias fueron ajustadas a un origen común (intersección de los ejes x-y) y la posición final del recorrido celular es indicado con los respectivos círculos rellenos. (D) Análisis de la velocidad en lapsos de tiempo de 10 minutos de las células que expresaron Lphn3WT marcada con mVenus y estimuladas con Flrt3^{ECD}-Fc. La línea punteada representa la media de la velocidad alcanzada por células no estimuladas. (E, F) Cuantificación de las distancias acumuladas y euclidianas (desplazamientos) antes (rojo) y después (naranja) de la incubación con Flrt3^{ECD}-Fc durante 1 hora. Los datos representan la media de al menos tres experimentos independientes (n = 3). Se analizaron alrededor 120 células totales por cada condición. Las barras de error indican el S.E.M., los valores de *p* son indicados con *: **** $p \leq 0,0001$, * $p \leq 0,05$. (G) Imágenes representativas obtenidas por microscopía de lapsos de tiempo de 10 minutos de cultivos de células HEK293 de baja confluencia que fueron transfectados con el plásmido codificante para cada condición indicada a diferentes tiempos: 0 h, 1 h y 3 h. La posición temporal de las células capturadas en un plano 2D es indicado con los puntos blancos y las letras A, B y C. Las líneas blancas representan la trayectoria de las células. Barra de escala: 50 μm . (H-J) Diagramas de trayectoria que muestran el recorrido de células individuales durante 3 h con las trayectorias ajustadas de forma similar a (B). Se analizaron de 45 a 55 células por campo de visión elegidos al azar. (K-M) Cuantificación las velocidades celulares, distancias acumuladas y euclidianas (desplazamientos). Subdominio A (GAIN Sub A) y B (GAIN Sub B) del dominio GAIN. Las construcciones de los receptores acoplados a mVenus son indicados con una estrella (★). Los datos representan la media de al menos tres experimentos independientes (n = 3). Se analizaron un total de 159 células por cada condición. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía. Las barras de error indican el S.E.M., Los valores de *p* entre los datos de Lphn3WT y el control (Ctrl) o S⁸¹⁰L son indicados con *: **** $p \leq 0,0001$, * $p \leq 0,05$.

7. Discusión

Las mutaciones son eventos moleculares que ocurren espontáneamente y que se acumulan a lo largo de la vida de un organismo. Aunque la mayoría de estas pueden ser inofensivas, algunas otras pueden llegar a afectar funciones celulares importantes que favorezcan o no el desarrollo de una enfermedad. El descubrimiento de nuevos genes mutados en diferentes entidades tumorales ha llevado a la caracterización sistemática de las mutaciones como un elemento esencial para la comprensión de la carcinogénesis y su progresión. A través del estudio de las mutaciones presentes en el dominio GAIN de Lphn3 de muestras provenientes de pacientes con cáncer de pulmón, evidenciamos que este dominio estuvo implicado en la adhesión y señalización de Lphn3; y que la sola presencia de Lphn3 en su estado silvestre, indujo características que recordaron el fenotipo celular de una migración ameboide la cual presenta propiedades como: redondeamiento celular, aumento en la motilidad de las células y disminución en los contactos de adhesión con la matriz, todos ellos observados en células HEK293 que expresaron al receptor Lphn3.

7.1. Análisis de las mutaciones de Lphn3 asociadas a cáncer en el modelado del dominio GAIN

Las estructuras cristalinas del dominio GAIN que existen actualmente, corresponden al receptor ADGRB3 de *Homo sapiens* y Lphn1/ADGRL1 de *Ratus norvegicus*. El análisis *in silico* del impacto de las mutaciones analizadas en este trabajo sobre la estructura del dominio GAIN fue previamente realizado en la tesis de Clemente-Pascacio B., (2015), reportando que dada la alta homología que existe entre los NTFs de las Lphns, fue posible identificar la posición de tres de las cinco mutaciones de Lphn3 de humano: K⁵⁶¹N, A⁷⁶⁰G y D⁷⁹⁸G [95]. En el modelado molecular del dominio GAIN de Lphn1, el cambio de la lisina (carga positiva) por una asparagina (sin carga) en la posición 561 generó la formación de varios puntos de interacción en la superficie del receptor; mientras que en la caracterización funcional realizada en este trabajo, este cambio en el GAIN de la Lphn3 redujo la activación del biosensor G13. Por su parte, el cambio de una alanina por una glicina en la posición 760, ambos aminoácidos no polares, no produjo cambios detectables en la estructura del dominio GAIN, sin embargo en la caracterización funcional, esta

mutación redujo la adhesión intercelular entre Lphn3 y Flrt3. Finalmente la sustitución de ácido aspártico (carga negativa) por histidina (carga positiva) en la posición 798 reveló diferentes puntos de interacción en la superficie del receptor y a nivel funcional esta mutación redujo la adhesión entre Lphn3 y Flrt3, así como la activación del biosensor G13.

A pesar de que no fue posible localizar las posiciones de las mutaciones S⁸¹⁰L y E⁸¹¹Q en el GAIN de Lphn1 de rata, la sustitución de serina (polar) por leucina (no polar) y ácido glutámico (carga negativa) por glutamina (sin carga), respectivamente, redujeron la actividad del sensor G13 y la presencia de deformaciones nucleares inducidos por Lphn3. Por su parte, S⁸¹⁰L también redujo la adhesión con Flrt3 y la motilidad celular. Todas las mutaciones que se analizaron independientemente, ya sea mostrando o no los cambios estructurales en el modelado molecular del dominio GAIN, alteraron diferentes niveles funcionales de Lphn3 en su estado constitutivo. Por lo que a través de este análisis, proponemos que el dominio GAIN podría actuar como un centro estructural para la señalización del receptor a través de su señalización por proteína G α 13. Esto se debe a que alteraciones en su integridad mermaron la señalización por esta vía; pero también puede tener una función como conector molecular entre el NTF y el CTF (similar a lo propuesto en el modelo alostérico), puesto que a pesar de no estar directamente implicado ni ser necesario para la formación inicial de interacciones heterofilicas intercelulares mediadas por dominios de adhesión aparentemente distantes con el GAIN, cambios en su integridad afectaron la adhesión con Flrt3. En un contexto tumorigénico estas modificaciones en los perfiles de adhesión y migración de Lphn3 inducidas por las mutaciones en el GAIN podría ser una estrategia que las células cancerosas usarían para transitar entre diferentes estados durante la progresión del cáncer.

7.2. Relación de la función de Lphn3 y sus variantes en un contexto de cáncer

Durante el análisis de la caracterización funcional de las mutaciones en el GAIN, llamó la atención el hecho de que la simple expresión de Lphn3 en células HEK293 indujo eventos celulares y moleculares que se asemejaron a los observados en un estado prometastásico y que se analizan a continuación para exponer el fondo de dicha propuesta.

El drástico cambio en la morfología de las células HEK293 bajo la expresión de Lphn3, fue de los eventos más impactantes en donde la forma alargada y plana con estructuras como lamelipodios y filopodios (que favorecen interacciones con la matriz), fue transformada a una forma redondeada con presencia de filopodios y blebs. Esta transición en la morfología inducida por Lphn3 recuerda a lo observado durante la TMA, que es considerada como un importante estado de transición celular que apoya la migración de las células cancerosas cuando abandonan su morfología inicial rica en lamelipodios para invadir otros tejidos [46, 49, 50]. Estos cambios morfológicos, coincidieron con el hecho de que las células que expresaron Lphn3 adquirieron un patrón de motilidad más rápido, siendo ésta una característica que apoya el estilo de migración ameboide en el cáncer [51]. Uno de los factores críticos en la motilidad ameboide es la activación de la miosina II [96] y ha sido reportado recientemente que el homólogo de Lphn, Cirl, es crucial para aumentar los niveles de activación de miosina durante la polaridad planar en embriones de *Drosophila* [97], por lo que Lphn3 también podría estar involucrada en la activación de miosina II.

Por su parte, la distribución de vimentina, considerado un marcador de la TEM, se reorganizó dramáticamente ante la presencia de la expresión de Lphn3, formando estructuras que impactaron la forma nuclear [52,53]. Estos hallazgos se asemejaron a los observados en células de melanoma cuando migraron por un estilo ameboide, en donde la vimentina fue localizada cercana al núcleo formando algunas veces redes de delgados filamentos que fueron necesarias para proteger el núcleo de las fuerzas contráctiles producidas principalmente por la actomiosina [82]. Estos hallazgos contribuyen a apoyar la idea de que la expresión de Lphn3 podría estar relacionada con un fenotipo de baja adherencia relacionado con un estado pro-metastásico. Manteniendo este mismo enfoque, la activación de Ga13 por Lphn3 en su estado constitutivo, es también de relevancia ya que la activación de esta vía está relacionada con la transformación oncogénica al promover proliferación celular, invasión y metástasis [98-100]. Por último, la expresión de Lphn3 fue capaz de influir en la migración celular colectiva, posiblemente ejerciendo una alteración en la respuesta y/o secreción celular de citoquinas y factores de crecimiento, lo que sugiere una modulación del microambiente de las células, en particular de los mecanismos de inflamación que se sabe que contribuyen a la progresión del cáncer.

Aún faltan muchos estudios para poder entender la función de Lphn3 en el cáncer, sin embargo estos hallazgos representan un acercamiento para futuras investigaciones y proponemos que la sobreexpresión de Lphn3 en un ambiente tumoral podría contribuir para facilitar las transiciones entre un fenotipo mesenquimal a uno ameboide, favoreciendo la plasticidad de células cancerosas en un proceso tan importante como es la migración durante la metástasis que integra elementos de señalización, citoesqueleto y adhesión.

Por su parte, dado que las mutaciones somáticas en el dominio GAIN no abatieron la mayoría de las funciones de Lphn3, se sugiere que su presencia en células cancerosas podría actuar como un regulador de las funciones del receptor en relación con las transiciones que experimenten para el desarrollo de la enfermedad. Por ejemplo, elementos del citoesqueleto como actina y vimentina y la vía de señalización por $G\alpha_{13}$, son indispensables para modular la formación de interacciones célula-célula o célula-matriz. En un ambiente tumoral, las interacciones entre las poblaciones celulares que la conforman podrían necesitar de la presencia de Lphn3 para establecer contactos con proteínas, que son ligandos del receptor y que en presencia de una de las mutantes analizadas se favoreciera un debilitamiento de los contactos intercelulares que llevaran en algún momento a las células a desprenderse del tumor primario y migrar hacia otros tejidos blanco. En este sentido, la mutante A⁷⁶⁰G fue identificada en otros tipos de cáncer como los de intestino y de próstata [83] en los cuales, así como en cáncer de pulmón se ha reportado la expresión de Flrt3 pero de manera disminuida la de teneurina 2, lo cual es interesante puesto que las mutaciones evaluadas disminuyeron la adhesión intercelular únicamente con Flrt3. [101]. Sin embargo, dado que estas mutaciones del receptor Lphn3 se estudiaron en un modelo heterólogo (células HEK293) y no en linajes celulares similares al de sus tejidos de origen, se necesitan estudios adicionales para esclarecer los mecanismos que desencadenan las variantes del dominio GAIN en el desarrollo de la carcinogénesis.

8. Conclusiones

1. Las mutaciones A⁷⁶⁰G, D⁷⁹⁸H y S⁸¹⁰L indujeron defectos intrínsecos del receptor que disminuyeron la estabilización de complejos de adhesión con Flrt3.
2. Mutaciones en el GAIN de Lphn3 asociadas a cáncer no alteraron la biogénesis, el procesamiento del GAIN ni la localización en la membrana celular de Lphn3.
3. Alteraciones en la integridad del dominio GAIN de Lphn3 causadas por mutaciones somáticas relacionadas a cáncer perturbaron la señalización por G α 13.
4. La remodelación de actina relacionada con la forma celular inducida por Lphn3 involucra mecanismos independientes a la vía Ga13.
5. La presencia de Lphn3 altera la remodelación del citoesqueleto de vimentina afectando la forma del núcleo, y estos efectos fueron atenuados por la presencia de las mutaciones S⁸¹⁰L y E⁸¹¹Q.
6. Los resultados obtenidos en ensayos de cierre de herida sugieren que la presencia de Lphn3 o sus variantes ejercieron intrínsecamente una regulación de tipo paracrina sobre la migración celular colectiva, debido a la disminución de la migración celular polarizada.
7. El dominio GAIN está involucrado en la regulación de las propiedades de motilidad celular inducidos por el receptor Lphn3.

9. Perspectivas

1. Investigar los mecanismos involucrados con la desestabilización de complejos de adhesión entre Lphn3 y Flrt3.
2. Evaluar las vías de señalización relacionadas con la remodelación del citoesqueleto de actina y vimentina inducido por Lphn3.
3. Realizar ensayos de motilidad celular con la mutante S⁸¹⁰L en presencia del ligando Flrt3.
4. Determinar los efectos de las mutaciones K⁵⁶¹N, A⁷⁶⁰G, D⁷⁹⁸H y E⁸¹¹Q sobre la motilidad celular en ausencia y presencia del ligando Flrt3.
5. Investigar las vías de señalización involucradas en la motilidad inducida por Lphn3.
6. Evaluar los efectos de lphn3 en un modelo de cáncer

10. Apéndices

10.1. Imágenes suplementarias

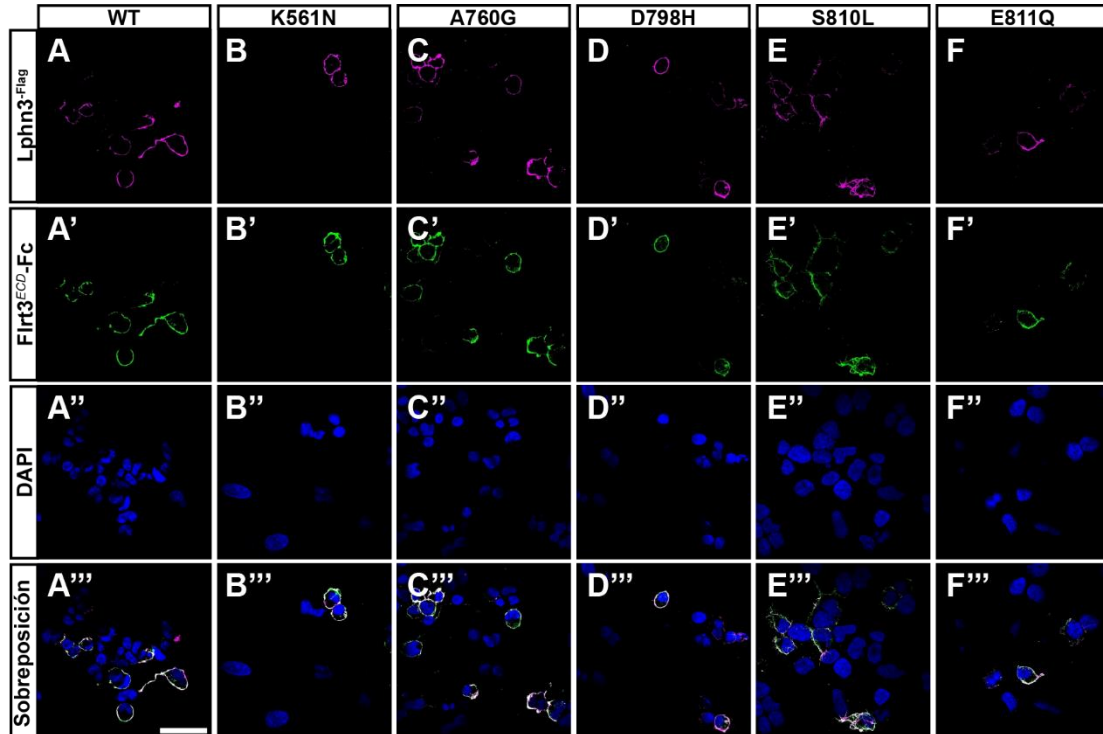


Figura S1. Flrt3 se unió únicamente a células que expresaron Lphn3 o sus variantes. (A-F) Imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal de células HEK293 que expresaron Lphn3 o sus variantes (magenta) y que fueron incubadas (A'-F') con Flrt3^{ECD}-Fc observando su señal en la superficie celular (verde). (A''-F'') Núcleos teñidos con DAPI. (A'''-F''') Sobreposición de las imágenes anteriores. Barra de escala de 50 μm .

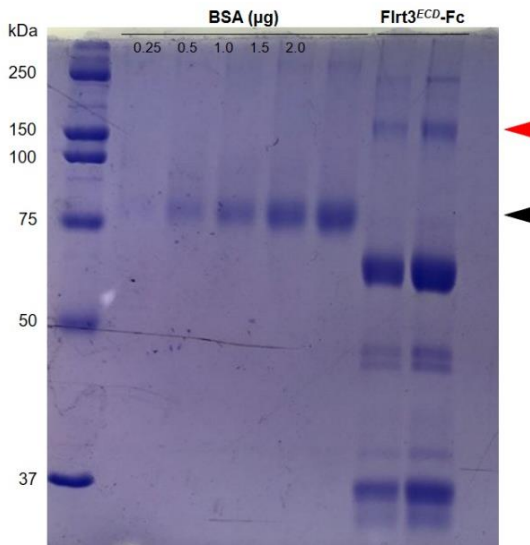


Figura S2. Purificación de Flrt3^{ECD}-Fc. Gel de acrilamida representativo teñido con azul de Coomassie que muestra la obtención de la versión soluble de Flrt3 (Flrt3^{ECD}-Fc) indicado con la cabeza de flecha roja. La cabeza de flecha negra indica la banda correspondiente a la albumina de suero bovino (BSA) utilizada para la cuantificación de proteína por densitometría.

10. 2. Materiales

10.2.1. Cepa bacteriana

Para la amplificación de plásmidos se transformaron bacterias de la cepa DH5 α de *Escherichia coli*, con una eficiencia de transformación $>1 \times 10^7$. Esta cepa presenta el siguiente genotipo: *F- 80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 y A1hsdR17 (rk-, mk+) phoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA1*. Y fueron crecidas en medio LB con 220 rpm a 37 °C.

10.2.2. Medios de cultivo

Tabla 1. Medios de cultivo empleados para el crecimiento de bacterias DH5 α

Medio de cultivo	Ingredientes (1L)
Caldo de lisogenia (LB)	10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl
Agar de lisogenia	10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl
Caldo de súper optimo crecimiento (SOB,)	20 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 0.584 g de NaCl, MgSO ₄ 10 mM

Tabla 2. Medio DMEM utilizado para el cultivo de rutina de células HEK293

Medio	Contenido (1L)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	10 % de SFB, 1000 U ml ⁻¹ de penicilina-estreptomomicina y 2 mM de GlutaMAX.

10.2.3. Antibióticos

Tabla 3. Concentración de antibióticos usados para la selección de bacterias transformadas

Antibiótico	Concentración de uso
Ampicilina (A043-25GM)	100 µg/ml
Kanamicina	50 µg/ml

10.2.4. Enzimas

Tabla 4. Enzimas usadas en las diferentes metodologías

Enzima	Aplicación
EcoR I (R6011)	Fusión de mVenus a plásmidos de Variantes de Lphn3
Bsu36 (N01-R0524S)	Fusión de mVenus a plásmidos de variantes de Lphn3
RNasa pancreática (10109169001)	Purificación de ADN
Lisozima (US14403-1GM)	Extracción de ADN
Tripsina 0.05% ()	Cultivo celular
Ligasa T4 DNA (M1801)	Ligaciones
Fosfatasa alcalina (M1821)	Ligaciones
DNasa	Ensayos de agregación celular

10.2.5. Kits comerciales

Tabla 5. Kits empleados para la clonación, extracción y purificación de ADN plasmídico

Nombre del kit	Aplicación
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)	Purificación de productos de PCR y de ADN plasmídico a partir de geles de agarosa.

Pure Yield Plasmid	Extracción de ADN plasmídico, para su posterior secuenciación.
Miniprep System (Promega)	Extracción midiprep por vacío

10.2.6. Reactivos

Tabla 6. Reactivos empleados en este estudio

Reactivo	Aplicación
Marcador de peso molecular de 0.5 – 10 Kb (M-204L)	Geles de agarosa
CHCl ₃	Purificación de ADN plasmídico
Alcohol absoluto (9000-03)	Extracción y purificación de ADN plasmídico
SFB (BIO-P6154-10GR)	Cultivo celular y ensayos de agregación
Isopropanol (1096345000)	Extracción y purificación de ADN plasmídico
PEG 8000, LiCl (L9650-100G), Fenol (P4557-400ML), Acetato de amonio (1011161000)	Purificación de ADN plasmídico
PEI max	Transfección celular
Coelenterazina 400 ^a (C-320)	Ensayos de BRET

10.2.7. Soluciones y amortiguadores no comerciales

Tabla 7. Soluciones no comerciales

SOLUCIÓN	CONTENIDO	APLICACIÓN
Solución I	50 Mm de glucosa, 25 mM de Tris-Cl	Extracción de ADN
Solución II	10 mM de EDTA, 0.2 N de NaOH, 1 % de SDS, pH 8.0.	Extracción de ADN
Solución III	5 M de CH ₃ CO ₂ K, 11.5 % de ácido acético glacial	Extracción de ADN
Buffer TE	10 mM de Tris pH 8.0, 1 mM de EDTA pH 8.0	Disolvente de ADN
Buffer TAE 1X	40 mM de Tris-acetato, 1 mM de EDTA	Electroforesis
TBST 1X	50 mM Tris.HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20.	Western blot

Buffer transferencia	3 g/L de Tris-Base, 14.4 g/L de glicina, 200 ml/L de metanol	Western blot
Buffer de corrida	25mM de Tris Cl 250 Mm de glicina y 0.1 % de SDS	SDS-PAGE
Solución de incubación	DMEM que contiene 50 mM de HEPES-NaOH pH 7.4, 10 % de SFB, 10 mM de CaCl ₂ y 10 mM de MgCl ₂	Ensayos de agregación
Solución de resuspensión	PBS 1X que contiene 1Mm de EGTA	Ensayos de agregación
Solución de siliconización	Éter de petróleo que contiene 0.2 % de silicona	Siliconización de pipetas pasteur
Buffer laemmli	50 Mm de Tris Cl pH 6.8, 100 Mm de DTT, 2% SDS, 0.1% de azul de bromofenol y 10% de glicerol	Western blot
Buffer BRET	10 mM Hepes-NaOH pH 7.4, 1 mM CaCl ₂ , 0.5 mM MgCl ₂ , 4.2 mM KCl, 146 mM NaCl, 5.5 mM glucosa	Ensayos de BRET

11. Referencias

1. Monk, K.R., et al., *Adhesion G Protein-Coupled Receptors: From In Vitro Pharmacology to In Vivo Mechanisms*. Mol Pharmacol, 2015. **88**(3): p. 617-23.
2. Li, J., et al., *Structural Basis for Teneurin Function in Circuit-Wiring: A Toxin Motif at the Synapse*. Cell, 2018. **173**(3): p. 735-748.e15.
3. Burbach, J.P.H. and D.H. Meijer, *Latrophilin's Social Protein Network*. Frontiers in Neuroscience, 2019. **13**.
4. Latorraca, N.R., A.J. Venkatakrisnan, and R.O. Dror, *GPCR Dynamics: Structures in Motion*. Chem Rev, 2017. **117**(1): p. 139-155.
5. Thal, D.M., et al., *Structural insights into G-protein-coupled receptor allostery*. Nature, 2018. **559**(7712): p. 45-53.
6. Fredriksson, R., et al., *The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints*. Mol Pharmacol, 2003. **63**(6): p. 1256-72.
7. Rosenbaum, D.M., S.G.F. Rasmussen, and B.K. Kobilka, *The structure and function of G-protein-coupled receptors*. Nature, 2009. **459**(7245): p. 356-363.
8. Hilger, D., M. Masureel, and B.K. Kobilka, *Structure and dynamics of GPCR signaling complexes*. Nat Struct Mol Biol, 2018. **25**(1): p. 4-12.
9. Downes, G.B. and N. Gautam, *The G protein subunit gene families*. Genomics, 1999. **62**(3): p. 544-52.
10. Simon, M.I., M.P. Strathmann, and N. Gautam, *Diversity of G proteins in signal transduction*. Science, 1991. **252**(5007): p. 802-8.
11. Khan, S.M., et al., *The expanding roles of G $\beta\gamma$ subunits in G protein-coupled receptor signaling and drug action*. Pharmacol Rev, 2013. **65**(2): p. 545-77.
12. Seo, M.J., et al., *Coevolution underlies GPCR-G protein selectivity and functionality*. Scientific Reports, 2021. **11**(1): p. 7858.
13. Manglik, A. and B. Kobilka, *The role of protein dynamics in GPCR function: insights from the β 2AR and rhodopsin*. Curr Opin Cell Biol, 2014. **27**: p. 136-43.
14. Bjarnadóttir, T.K., et al., *The human and mouse repertoire of the adhesion family of G-protein-coupled receptors*. Genomics, 2004. **84**(1): p. 23-33.
15. Krasnoperov, V., et al., *Post-translational proteolytic processing of the calcium-independent receptor of alpha-latrotoxin (CIRL), a natural chimera of the cell adhesion protein and the G protein-coupled receptor. Role of the G protein-coupled receptor proteolysis site (GPS) motif*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 46518-26.
16. Araç, D., et al., *A novel evolutionarily conserved domain of cell-adhesion GPCRs mediates autoproteolysis*. Embo j, 2012. **31**(6): p. 1364-78.
17. Liebscher, I. and T. Schöneberg, *Tethered Agonism: A Common Activation Mechanism of Adhesion GPCRs*. Handb Exp Pharmacol, 2016. **234**: p. 111-125.
18. Southern, C., et al., *Screening β -arrestin recruitment for the identification of natural ligands for orphan G-protein-coupled receptors*. J Biomol Screen, 2013. **18**(5): p. 599-609.
19. Boucard, A.A., S. Maxeiner, and T.C. Südhof, *Latrophilins function as heterophilic cell-adhesion molecules by binding to teneurins: regulation by alternative splicing*. J Biol Chem, 2014. **289**(1): p. 387-402.
20. Yeung, J., et al., *GPR56/ADGRG1 is a platelet collagen-responsive GPCR and hemostatic sensor of shear force*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(45): p. 28275-28286.

21. Yang, L., et al., *GPR56 Regulates VEGF production and angiogenesis during melanoma progression*. *Cancer Res*, 2011. **71**(16): p. 5558-68.
22. Waller-Evans, H., et al., *The orphan adhesion-GPCR GPR126 is required for embryonic development in the mouse*. *PLoS One*, 2010. **5**(11): p. e14047.
23. Rötke, J., et al., *Involvement of the Adhesion GPCRs Latrophilins in the Regulation of Insulin Release*. *Cell Rep*, 2019. **26**(6): p. 1573-1584.e5.
24. Gonçalves Silva, I., et al., *The Tim-3-galectin-9 Secretory Pathway is Involved in the Immune Escape of Human Acute Myeloid Leukemia Cells*. *EBioMedicine*, 2017. **22**: p. 44-57.
25. Domené, S., et al., *Screening of human LPHN3 for variants with a potential impact on ADHD susceptibility*. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2011. **156b**(1): p. 11-8.
26. Boyden, S.E., et al., *Vibratory Urticaria Associated with a Missense Variant in ADGRE2*. *N Engl J Med*, 2016. **374**(7): p. 656-63.
27. Krishnan, A., et al., *Classification, Nomenclature, and Structural Aspects of Adhesion GPCRs*, in *Adhesion G Protein-coupled Receptors: Molecular, Physiological and Pharmacological Principles in Health and Disease*, T. Langenhan and T. Schöneberg, Editors. 2016, Springer International Publishing: Cham. p. 15-41.
28. Liebscher, I., et al., *A tethered agonist within the ectodomain activates the adhesion G protein-coupled receptors GPR126 and GPR133*. *Cell Rep*, 2014. **9**(6): p. 2018-26.
29. Wilde, C., et al., *The constitutive activity of the adhesion GPCR GPR114/ADGRG5 is mediated by its tethered agonist*. *Faseb j*, 2016. **30**(2): p. 666-73.
30. Kan, Z., et al., *Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers*. *Nature*, 2010. **466**(7308): p. 869-73.
31. Chiang, N.Y., et al., *Disease-associated GPR56 mutations cause bilateral frontoparietal polymicrogyria via multiple mechanisms*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(16): p. 14215-25.
32. Vizurraga, A., et al., *Mechanisms of adhesion G protein-coupled receptor activation*. *J Biol Chem*, 2020. **295**(41): p. 14065-14083.
33. Okajima, D., G. Kudo, and H. Yokota, *Brain-specific angiogenesis inhibitor 2 (BAI2) may be activated by proteolytic processing*. *J Recept Signal Transduct Res*, 2010. **30**(3): p. 143-53.
34. Barros-Álvarez, X., et al., *The tethered peptide activation mechanism of adhesion GPCRs*. *Nature*, 2022.
35. Ping, Y.-Q., et al., *Structural basis for the tethered peptide activation of adhesion GPCRs*. *Nature*, 2022.
36. Qu, X., et al., *Structural basis of tethered agonism of the adhesion GPCRs ADGRD1 and ADGRF1*. *Nature*, 2022.
37. Xiao, P., et al., *Tethered peptide activation mechanism of the adhesion GPCRs ADGRG2 and ADGRG4*. *Nature*, 2022.
38. Boucard, A.A., *Self-activated adhesion receptor proteins visualized*. *Nature*, 2022. **604**(7907): p. 628-630.
39. Salzman, G.S., et al., *Structural Basis for Regulation of GPR56/ADGRG1 by Its Alternatively Spliced Extracellular Domains*. *Neuron*, 2016. **91**(6): p. 1292-1304.
40. Salzman, G.S., et al., *Stachel-independent modulation of GPR56/ADGRG1 signaling by synthetic ligands directed to its extracellular region*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017. **114**(38): p. 10095-10100.
41. Krasnoperov, V.G., et al., *alpha-Latrotoxin stimulates exocytosis by the interaction with a neuronal G-protein-coupled receptor*. *Neuron*, 1997. **18**(6): p. 925-37.

42. Sugita, S., et al., *alpha-Latrotoxin receptor CIRL/latrophilin 1 (CL1) defines an unusual family of ubiquitous G-protein-linked receptors. G-protein coupling not required for triggering exocytosis.* J Biol Chem, 1998. **273**(49): p. 32715-24.
43. Del Toro, D., et al., *Structural Basis of Teneurin-Latrophilin Interaction in Repulsive Guidance of Migrating Neurons.* Cell, 2020. **180**(2): p. 323-339.e19.
44. Lu, Y.C., et al., *Structural Basis of Latrophilin-FLRT-UNC5 Interaction in Cell Adhesion.* Structure, 2015. **23**(9): p. 1678-1691.
45. Boucard, A.A., J. Ko, and T.C. Sudhof, *High affinity neurexin binding to cell adhesion G-protein-coupled receptor CIRL1/latrophilin-1 produces an intercellular adhesion complex.* J Biol Chem, 2012. **287**(12): p. 9399-413.
46. Sando, R. and T.C. Sudhof, *Latrophilin GPCR signaling mediates synapse formation.* Elife, 2021. **10**.
47. Yasinska, I.M., et al., *The Tim-3-Galectin-9 Pathway and Its Regulatory Mechanisms in Human Breast Cancer.* Front Immunol, 2019. **10**: p. 1594.
48. Lee, C.S., et al., *Identification of Latrophilin-2 as a Novel Cell-Surface Marker for the Cardiomyogenic Lineage and Its Functional Significance in Heart Development.* Circulation, 2019. **139**(25): p. 2910-2912.
49. Cruz-Ortega, J.S. and A.A. Boucard, *Actin cytoskeleton remodeling defines a distinct cellular function for adhesion G protein-coupled receptors ADGRL/latrophilins 1, 2 and 3.* Biol Open, 2019. **8**(4).
50. Tobaben, S., T.C. Südhof, and B. Stahl, *The G protein-coupled receptor CLI interacts directly with proteins of the Shank family.* J Biol Chem, 2000. **275**(46): p. 36204-10.
51. Mathiasen, S., et al., *G12/13 is activated by acute tethered agonist exposure in the adhesion GPCR ADGRL3.* Nat Chem Biol, 2020. **16**(12): p. 1343-1350.
52. Moreno-Salinas, A.L., et al., *Convergent selective signaling impairment exposes the pathogenicity of latrophilin-3 missense variants linked to inheritable ADHD susceptibility.* Mol Psychiatry, 2022.
53. Arcos-Burgos, M., et al., *A common variant of the latrophilin 3 gene, LPHN3, confers susceptibility to ADHD and predicts effectiveness of stimulant medication.* Mol Psychiatry, 2010. **15**(11): p. 1053-66.
54. Kotepui, K.U., et al., *Tissue Expression Of LPHN3 in Breast Cancer: An Immunohistochemistry Method.* Asian Pac J Cancer Prev, 2020. **21**(11): p. 3339-3343.
55. Kotepui, M., et al., *Quantitative real-time RT-PCR of ITGA7, SVEP1, TNS1, LPHN3, SEMA3G, KLB and MMP13 mRNA expression in breast cancer.* Asian Pac J Cancer Prev, 2012. **13**(11): p. 5879-82.
56. Jackson, V.A., et al., *Structural basis of latrophilin-FLRT interaction.* Structure, 2015. **23**(4): p. 774-81.
57. Lu, Y.C., et al., *Structural Basis of Latrophilin-FLRT-UNC5 Interaction in Cell Adhesion.* Structure, 2015. **23**(9): p. 1678-1691.
58. Zhang, R.S., K. Liakath-Ali, and T.C. Sudhof, *Latrophilin-2 and latrophilin-3 are redundantly essential for parallel-fiber synapse function in cerebellum.* Elife, 2020. **9**.
59. Sando, R., X. Jiang, and T.C. Sudhof, *Latrophilin GPCRs direct synapse specificity by coincident binding of FLRTs and teneurins.* Science, 2019. **363**(6429).
60. Faiz, A., et al., *Latrophilin receptors: novel bronchodilator targets in asthma.* Thorax, 2017. **72**(1): p. 74-82.
61. Wang, J., et al., *Driver mutations in ADGRL3 are involved in the evolution of ependymoma.* Lab Invest, 2022.

62. Oohashi, T., et al., *Mouse ten-m/Odz is a new family of dimeric type II transmembrane proteins expressed in many tissues*. J Cell Biol, 1999. **145**(3): p. 563-77.
63. Zhou, X.H., et al., *The murine Ten-m/Odz genes show distinct but overlapping expression patterns during development and in adult brain*. Gene Expr Patterns, 2003. **3**(4): p. 397-405.
64. Silva, J.P., et al., *Latrophilin 1 and its endogenous ligand Lasso/teneurin-2 form a high-affinity transsynaptic receptor pair with signaling capabilities*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(29): p. 12113-8.
65. Berns, D.S., et al., *Teneurin-3 controls topographic circuit assembly in the hippocampus*. Nature, 2018. **554**(7692): p. 328-333.
66. O'Sullivan, M.L., et al., *FLRT proteins are endogenous latrophilin ligands and regulate excitatory synapse development*. Neuron, 2012. **73**(5): p. 903-10.
67. Yamagishi, S., et al., *FLRT2 and FLRT3 act as repulsive guidance cues for Unc5-positive neurons*. Embo j, 2011. **30**(14): p. 2920-33.
68. Global Cancer Observatory. *CANCER TODAY*. 2020, December; Available from: <https://gco.iarc.fr/>.
69. Hanahan, D., *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*. Cancer Discov, 2022. **12**(1): p. 31-46.
70. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
71. Olea-Flores, M., et al., *New Actors Driving the Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: The Role of Leptin*. Biomolecules, 2020. **10**(12).
72. Song, I.H., et al., *Expression and prognostic significance of epithelial-mesenchymal transition-related markers and phenotype in serous ovarian cancer*. Pathol Res Pract, 2018. **214**(10): p. 1564-1571.
73. Vleminckx, K., et al., *Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role*. Cell, 1991. **66**(1): p. 107-19.
74. Mrozik, K.M., et al., *N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer*. BMC Cancer, 2018. **18**(1): p. 939.
75. Weber, G.F., M.A. Bjerke, and D.W. DeSimone, *Integrins and cadherins join forces to form adhesive networks*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 8): p. 1183-93.
76. Bolós, V., et al., *The dual kinase complex FAK-Src as a promising therapeutic target in cancer*. Onco Targets Ther, 2010. **3**: p. 83-97.
77. Alpha, K.M., W. Xu, and C.E. Turner, *Paxillin family of focal adhesion adaptor proteins and regulation of cancer cell invasion*. Int Rev Cell Mol Biol, 2020. **355**: p. 1-52.
78. Price, L.S., et al., *Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading*. Mol Biol Cell, 1998. **9**(7): p. 1863-71.
79. Zhou, K., et al., *RAC1-GTP promotes epithelial-mesenchymal transition and invasion of colorectal cancer by activation of STAT3*. Lab Invest, 2018. **98**(8): p. 989-998.
80. Khoo, A.S., et al., *Breast Cancer Cells Transition from Mesenchymal to Amoeboid Migration in Tunable Three-Dimensional Silk-Collagen Hydrogels*. ACS Biomater Sci Eng, 2019. **5**(9): p. 4341-4354.
81. Panková, K., et al., *The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(1): p. 63-71.

82. Lavenus, S.B., et al., *A flexible network of vimentin intermediate filaments promotes migration of amoeboid cancer cells through confined environments*. J Biol Chem, 2020. **295**(19): p. 6700-6709.
83. Tate, J.G., et al., *COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*. Nucleic Acids Research, 2018. **47**(D1): p. D941-D947.
84. Raimondi, F., et al., *Rare, functional, somatic variants in gene families linked to cancer genes: GPCR signaling as a paradigm*. Oncogene, 2019. **38**(38): p. 6491-6506.
85. Wu, V., et al., *Illuminating the Onco-GPCRs: Novel G protein-coupled receptor-driven oncocrine networks and targets for cancer immunotherapy*. J Biol Chem, 2019. **294**(29): p. 11062-11086.
86. Schulte, G. and S.C. Wright, *Frizzleds as GPCRs - More Conventional Than We Thought!* Trends Pharmacol Sci, 2018. **39**(9): p. 828-842.
87. Aust, G., L. Zheng, and M. Quaas, *To Detach, Migrate, Adhere, and Metastasize: CD97/ADGRE5 in Cancer*. Cells, 2022. **11**(9).
88. Khare, T., M. Bissonnette, and S. Khare, *CXCL12-CXCR4/CXCR7 Axis in Colorectal Cancer: Therapeutic Target in Preclinical and Clinical Studies*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(14).
89. Dutra-Oliveira, A., R.Q. Monteiro, and A. Mariano-Oliveira, *Protease-activated receptor-2 (PAR2) mediates VEGF production through the ERK1/2 pathway in human glioblastoma cell lines*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **421**(2): p. 221-7.
90. Ovando-Zambrano, J.C., J.A. Arias-Montano, and A.A. Boucard, *Alternative splicing event modifying ADGRL1/latrophilin-1 cytoplasmic tail promotes both opposing and dual cAMP signaling pathways*. Ann N Y Acad Sci, 2019. **1456**(1): p. 168-185.
91. Olsen, R.H.J., et al., *TRUPATH, an open-source biosensor platform for interrogating the GPCR transducerome*. Nat Chem Biol, 2020. **16**(8): p. 841-849.
92. Ankam, S., et al., *Temporal Changes in Nucleus Morphology, Lamin A/C and Histone Methylation During Nanotopography-Induced Neuronal Differentiation of Stem Cells*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2018. **6**.
93. Terriac, E., S. Schütz, and F. Lautenschläger, *Vimentin Intermediate Filament Rings Deform the Nucleus During the First Steps of Adhesion*. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2019. **7**.
94. Biedzinski, S., et al., *Microtubules deform the nucleus and force chromatin reorganization during early differentiation of human hematopoietic stem cells*. 2019.
95. Pascacio, B.A.C., *Generación de mutaciones puntuales en el receptor acoplado a proteínas G Latrofilina 3, y expresión de los receptores nativo y mutados en células HEK-293T*, in *Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias*. 2015, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. p. 87.
96. Ghosh, I., et al., *Switching between blebbing and lamellipodia depends on the degree of non-muscle myosin II activity*. J Cell Sci, 2021. **134**(1).
97. Lavalou, J., et al., *Formation of polarized contractile interfaces by self-organized Toll-8/Cir1 GPCR asymmetry*. Dev Cell, 2021. **56**(11): p. 1574-1588.e7.
98. Grzelinski, M., et al., *Critical Role of Ga12 and Ga13 for Human Small Cell Lung Cancer Cell Proliferation In vitro and Tumor Growth In vivo*. Clinical Cancer Research, 2010. **16**(5): p. 1402-1415.
99. Yagi, H., et al., *A synthetic biology approach reveals a CXCR4-G13-Rho signaling axis driving transendothelial migration of metastatic breast cancer cells*. Sci Signal, 2011. **4**(191): p. ra60.

100. Lim, W.K., et al., *Ga-13 induces CXC motif chemokine ligand 5 expression in prostate cancer cells by transactivating NF- κ B*. *J Biol Chem*, 2019. **294**(48): p. 18192-18206.
101. Uhlén, M., et al., *Proteomics. Tissue-based map of the human proteome*. *Science*, 2015. **347**(6220): p. 1260419.