



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**“Impacto de la autoproteólisis en el perfil de acoplamiento a proteínas G
del GPCR de adhesión latrofilina 3”**

TESIS

Que presenta:

B. M. Petra Lizbeth Segura Landa

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOLOGÍA CELULAR

Director de Tesis:

Dr. Antony Boucard Jr.

Ciudad de México

Julio del 2022

Este trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. Antony Boucard Jr. en el laboratorio 54 del departamento de Biología Celular en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Agradecimiento especial al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado a través de la beca 456251 para la realización de la Maestría en Ciencias en la especialidad en Biología Celular.

Agradecimientos

A Dios, por permitirme estar en este lugar y culminar esta bonita etapa de mi vida.

Gracias a los doctores Guadalupe Reyes Cruz y Enrique Othon Hernandez González por su disponibilidad, aportaciones a este proyecto y por ser parte de mi formación académica durante clases.

A mi director de tesis Dr. Antony Boucard Jr, por darme la oportunidad y confianza de formar parte de su equipo de laboratorio. Además, por la motivación y formación que siempre nos brinda durante nuestro trayecto en el laboratorio.

A mis padres Candelario Segura Alcibar y Ma. De Jesús Landa Ramírez por todo el amor, confianza y comprensión que me ha dado.

A mi hermana y sobrinas.

A todos los miembros del laboratorio 54 del Departamento Biología celular por las contribuciones a mi desarrollo académico y por los momentos agradables que hemos compartido.

A Kerlys, Sheila, Brenda, Estefanía, Ana y al señor Ricardo por hacer más ameno el ambiente del laboratorio, sus excelentes observaciones a mi trabajo, su paciencia y su conocimiento compartido.

A Juanita, a quien agradezco su amistad, tu gran amabilidad y tu entusiasmo en realizar tu labor.

A mis compañeros de generación: Janik, Ivan, Monserrat, Fernando, Chayo, Theresa y Kevin.

Al doctor José Manuel Reyes Ruiz quien me motivo a iniciar la maestría, me dio ánimos y me apoyo.

A mis mejores amigos Daniel y Alison, gracias por estar conmigo siempre.

Dedicatoria

Dedicó con todo mi corazón esta tesis
a mis padres, hermana y sobrinas,
que han creído en mí
y me ayudado en mi formación personal
y académica,
los amo.

Petra

Índice

RESUMEN	vii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABLAS	xi
1. Antecedentes.....	1
1.1 GPCRs.....	1
1.2 GPCR de adhesión	3
1.3 Latrofilinas	4
1.4 Dominios y ligandos de latrofilina	5
1.5 Latrofilina 3.....	7
2. Justificación.....	9
3. Planteamiento del problema.	9
4. Hipótesis.....	9
5. Objetivos.....	9
5.1 General.....	9
5.2 Particulares.....	9
6 Materiales	11
7 Métodos	16
7.4 Transformación de la construcción generada en bacterias competentes.....	21
7.5 Miniprep y digestión con endonucleasas	21
7.6 Midiprep.....	22
7.7 Secuenciación.....	23
7.8 Transfección por polietilenimina (PEI).....	23
7.9 Extracción de proteínas totales.....	24
7.10 Western blot	24
7.11 Detección de expresión de superficie celular (DESC)	25
7.12 Perfil de señalización	26
8 Resultados.....	29
8.1 Generación de Fragmentos en PCR sobrelapada	29
8.2 Digestión con endonucleasas del plásmido Lphn3	29
8.3 Transformación de bacterias y amplificación	30
8.4 Secuenciación.....	32
8.5 Western Blotting	33

8.6	Expresión membranal del receptor Lphn3T869G.....	35
8.7	Perfil de acople a proteínas G de la variante Lphn3T869G	36
9	Discusión	45
10	Conclusión	49
11	Perspectivas.....	50
12	Referencias.....	51

RESUMEN

Los receptores de adhesión acoplados a proteínas G (aGPCR) cuentan con un fragmento extracelular largo NTF que contiene varios dominios de adhesión proteína-proteína y un sitio de autoproteólisis dentro de un dominio denominado GAIN que engloba el sitio de corte GPS, el cual genera un fragmento CTF caracterizado por tener 7 dominios transmembranales interconectados por asas extra- e intracelulares. Miembros de aGPCRs denominados Latrofilinas (Lphns) presentan 3 isoformas (Lphn1, Lphn2 y Lphn3), con mayor expresión en el cerebro donde participan en la formación de las sinapsis y adhesión intercelular. La Lphn3 se destaca por ser involucrada en trastornos del neurodesarrollo. Sin embargo, se desconoce la importancia de la autoproteólisis en la vía de acoplamiento a proteínas G que podría activarse en este receptor. En este proyecto, se utilizará el método de mutagénesis dirigida para modificar el sitio de corte GPS y así generar un mutante no escindible de Lphn3. Posteriormente, se analizará el impacto de la mutación sobre el perfil de acoplamiento funcional entre Lphn3 y varias familias de proteínas G utilizando biosensores basados en transferencia de energía de resonancia de bioluminescencia (BRET). Esto nos permitirá comprender el papel biológico de la autoproteólisis en procesos de señalización intracelular mediados por los aGPCRs.

ABSTRACT

The G-protein-coupled adhesion receptors (aGPCRs) have a long extracellular fragment NTF containing several protein-protein adhesion domains. Also, these receptors include an autoproteolysis site within a GAIN domain that encompasses the GPS cleavage site, generating a CTF fragment characterized by seven transmembrane domains interconnected by extra- and intracellular loops. Members of aGPCRs called Latrophilins (Lphns) present three isoforms (Lphn1, Lphn2, and Lphn3), with higher expression in the brain where they participate in the formation of synapses and intercellular adhesion. Lphn3 stands out for being involved in neurodevelopmental disorders. However, the importance of autoproteolysis in the G protein-coupling pathway that could be activated in this receptor is unknown. At this project, we will use targeted mutagenesis to modify the GPS cleavage site to generate a non-cleavable mutant of Lphn3. Subsequently, the impact of the mutation on the functional coupling profile between Lphn3 and several G-protein families will be analyzed using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based biosensors. These will help understand the biological role of autoproteolysis in intracellular signaling processes mediated by aGPCRs.

LISTA DE ABREVIATURAS

7TM	Siete dominios transmembranales
aa	aminoácidos
AC	Adenilil ciclasas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNp	ADN plasmídico
aGPCR	Receptores acoplados a Proteínas G de adhesión
AMPc	Receptores acoplados a Proteínas G de adhesión
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Albúmina de suero
BRET	Transferencia de energía por resonancia de Bioluminiscencia
Buffer TE	Buffer Tris-EDTA
Buffer TBST	Tris- buffer salina (TBS) y Tween 20
CTF	Fragmento C-Terminal
DESC	Detección de la expresión de la superficie celular
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
FLRT	Proteína transmembrana rica en leucina que contienen un dominio tipo fibronectina
g	Gramo
GAIN	Dominio de inducción para autoproteólisis de los GPCRs
GDP	Guanosina difosfato
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GFP	Proteína verde fluorescente
GPCRs	Receptores Acoplados a proteínas G
GPS	Sitio de proteólisis de los GPCRs
GTP	Guanosina trifosfato
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
iBRET	Indice BRET inverso
Kb	Kilo bases
kDa	Kilo Daltons
L	Litro

LB	Luria Bertani
Lphn	Latrofilina
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N	Nomal
NTF	Fragmento N-terminal
pb	Pares de bases
PBS	Buffer de fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
pH	Potencial de hidrógeno
PEI	Polietilenimina
PFA	Paraformaldehído
Rluc8	Renilla luciferasa 8
RPM	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
SFB	Suero Fetal Bovino
SNC	Sistema nervioso central
ST	Sin Transfectar
TBS	Buffer salino con Tris
TDAH	Trastorno de Déficit de atención e Hiperactividad
UFC	Unidades formadoras de colonias
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μM	Micromolar

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Receptores acoplados a proteínas G (GPCR)	1
Figura 2. Clasificación de la super familia de las GPCR	3
Figura 3. Estructura de Lphn.	5
Figura 4. Emparejamiento de latrofilina-ligandos en la sinapsis de los mamíferos.	5
Figura 5. Distribución de Latrofilina en los órganos.	7
Figura 6. Acople de proteínas G del receptor Lphn3.	8
Figura 7. Diagrama de trabajo.	16
Figura 8. Esquema de la elaboración de la PCR sobrepuesta.	16
Figura 9. Representación de los pasos para la elaboración de WB.	25
Figura 10. Representación de los pasos para la elaboración de DESC.	26
Figura 11. Esquematización del fundamento de BRET.	28
Figura 12. Corrimiento electroforético para fragmentos de PCR sobrelapada.	29
Figura 13. Digestión con endonucleasas del plásmido.	30
Figura 14. Crecimiento e bacterias transformadas.	30
Figura 15. Amplificación de ADN mutante.	31
Figura 16. Corte con endonucleasas de la variante Lphn3T869G.	32
Figura 17. Resultados de secuenciación para Lphn3T869G.	33
Figura 18. Expresión de Lphn3 WT y la mutante Lphn3T869G.	35
Figura 19. Expresión de membrana de Lphn3 WT y la mutante Lphn3T869G.	36
Figura 20. Perfil de acoplamiento comparativo de la variante Lphn3T869G a los biosensores Gi1-Gi2.-Gi3, relacionados a la inhibición de niveles de AMPc.	39
Figura 21. Perfil de acoplamiento comparativo de la variante Lphn3T869G al biosensor GsS, relacionados a la activación de niveles de AMPc	40
Figura 22. Perfil de acoplamiento comparativo de la variante Lphn3T869G a los biosensores G11-GQ, relacionados a la modulación de calcio.	41
Figura 23. Perfil de acoplamiento comparativo de la variante Lphn3T869G a los biosensores G12-G13, relacionados a la modulación de Rho.	42

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Reactivos empleados.	11
Tabla 2. Anticuerpos.	14
Tabla 3. Enzimas y sustratos.	15
Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados para la extensión sobrepuesta.	17
Tabla 5. Combinación de fragmentos generados.	17
Tabla 6. Contenido de la reacción de PCR para fragmentos individuales.	18
Tabla 7. Condiciones de la PCR en Termociclador marca BioRad T100™	19
Tabla 8. Restricción del inserto y del vector.	19
Tabla 9. Condiciones de ligación.	20
Tabla 10. Condiciones de la comprobación por endonucleasas.	22
Tabla 11. Complejos de transfección BRET.	27
Tabla 12. Condiciones de la lectura BRET en Cytation 5.	28

1. Antecedentes

1.1 GPCRs

La super familia de GPCR es la familia más grande de receptores de superficie. En mamíferos se conocen más de 1,000 miembros de esta familia, codificados por mil genes aproximadamente, tan solo en los seres humanos hay más de 800 GPCR, encargados de mediar la mayoría de las respuestas a las señales del mundo exterior, así como de otras células (Alberts et al., 2002; Langenhan et al., 2016; Ritter and Hall, 2009).

Los GPCRs tienen una estructura similar a pesar de que presentan aminoácidos específicos para cada receptor que actúan de forma selectiva en la unión con su respectivo ligando. Los GPCRs atraviesan la bicapa lipídica 7 veces a través de una estructura cilíndrica, conformada de siete dominios transmembrana (TM7) de hélices α conectadas por tres asas extracelulares (E1, E2 y E3) y tres asas intracelulares (C1, C2, C3), un dominio amino-terminal extracelular que posee residuos de asparagina (sitios de N-glicosilación) y residuos de cisteína que influyen el plegamiento de la proteína y un dominio carboxilo-terminal hidrofílico intracelular que puede contener residuos de serina o tirosina (sirven como sustratos de fosforilación por cinasas y la desensibilización del receptor) (Langenhan and Schöneberg, 2016) (Figura 1).

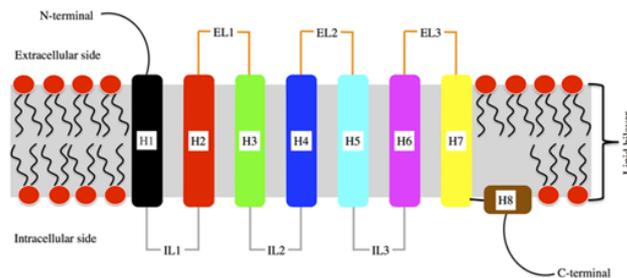


Figura 1. Receptores Acoplados a Proteínas G (GPCRs). Esquema de la estructura general de un receptor acoplado a proteína G (GPCR), las hélices están conectadas por los bucles intracelulares (IL) y extracelulares (EL) (Tomado de: Fossepré M. *et. al* 2014).

Los GPCR pueden ser activados por una gran variedad de ligandos, como hormonas, neurotransmisores, partículas subatómicas (un fotón), iones (H^+ y Ca^{++}), pequeñas moléculas orgánicas, péptidos y proteínas. Después de la activación, los GPCR se asocian con proteínas G heterotriméricas para estimular la señalización mediada por proteínas G. Las proteínas G están compuestas por tres subunidades proteicas: α , β y γ . En el estado inactivo la proteína G

tiene en la subunidad α unida a guanosina difosfato (GDP). Para la activación, GPCR actúa como un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF), impulsa a la subunidad α a liberar su GDP unido, permitiendo que guanosina trifosfato (GTP) se una. La unión del GTP provoca un cambio conformacional activador en la subunidad $G\alpha$, libera la proteína G del receptor y provoca la disociación de la subunidad $G\alpha$ unida a GTP de las subunidades $G\beta\gamma$ ambos interactúan entonces con varios objetivos, como las enzimas y los canales iónicos de la membrana plasmática, que transmiten la señal hacia el interior de la célula (Alberts et al., 2002; Langenhan and Schöneberg, 2016; Ritter and Hall, 2009).

Las proteínas G heterotriméricas se clasifican por la identidad de su subunidad $G\alpha$ en cuatro familias: *Gas*, *Gai/o*, *Gaq/11* y *Ga12/13*. Las proteínas *Gas* estimulan a las adenilil ciclasas (ACs) y la síntesis de AMP cíclico (AMPc). Las proteínas *Gai/o* inhiben a las ACs. La clase *Ga12/13* actúa activando a las proteínas Rho. Las proteínas *Gaq/11* activan la hidrólisis de fosfoinosítidos a través de las isoformas β de la fosfolipasa C (PLC). Las subunidades $G\beta\gamma$ pueden regular diversos efectores, como fosfolipasas, ACs y canales iónicos (Alberts et al., 2002; Kobilka, 2007).

Los GPCRs son clasificados principalmente en 5 familias: glutamato, rodopsina, adhesión, Fizzled y secretina. Los GPCR de adhesión (aGPCRs) constituyen la segunda familia más grande, con 33 miembros en el genoma humano. Los aGPCRs controlan las interacciones célula-célula y célula-matriz; son necesarios para una variedad de eventos de desarrollo en el sistema nervioso, como el cierre del tubo neural y la sinaptogénesis hasta la mielinización y más allá (Langenhan et al., 2016) (Figura 2).

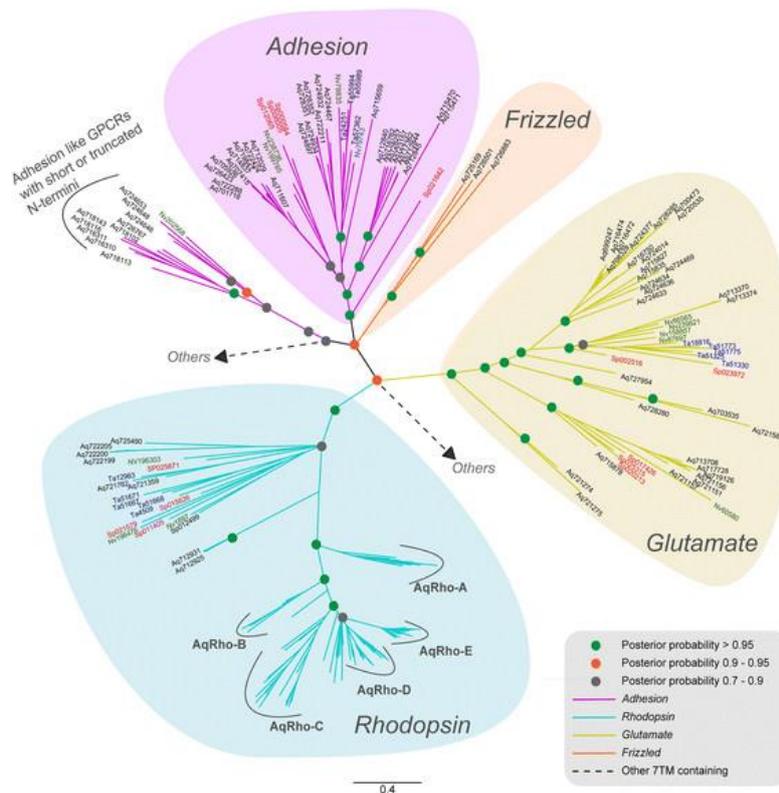


Figura 2. Clasificación de la super familia de los GPCR. La clasificación GRAFS agrupa a los GPCRs en cinco familias fundamentales: Glutamato, Rodopsina, Adhesión, Frizzled y Secretina (Tomado de Krishnan A. *et. al* 2014).

1.2 GPCR de adhesión

Aproximadamente hay 33 miembros de aGPCR en humanos y 30 miembros en ratones y ratas, más de la mitad de estos receptores se expresan en el sistema nervioso central (SNC), lo que indica su posible papel en el desarrollo y la función del SNC, implicados en la regulación de la neurulación, el desarrollo cortical y el crecimiento de neuritas (Strokes and Piao, 2010).

Todos los miembros de la familia aGPCR tienen un motivo GPS (Sitio de proteólisis del GPCR), un sitio de proteólisis constituida por una secuencia conservada de ~ 50 aminoácidos(aa), entre un residuo alifático conservado (una leucina) y un residuo de treonina, serina o cisteína en el sitio HL↓T/S/C localizada entre dos láminas β en la región extracelular amino terminal que precede al primer segmento transmembranal (~15-30 aa de distancia) (Langenhan and Schöneberg, 2016). El motivo GPS forma parte de un dominio de ~320 aa, llamado dominio de inducción de autoproteólisis de GPCRs (GAIN), que resulta necesario para que se lleve a cabo la escisión. El dominio GAIN está situado inmediatamente en N-terminal (NTF) del TM. La autoproteólisis es un proceso postraduccional intramolecular ampliamente

utilizado que convierte los precursores de proteínas inactivos en proteínas maduras biológicamente activas. El evento autoproteolítico en Lphn genera una proteína bipartita compuesta por un fragmento N-terminal extracelular (NTF) y un fragmento C-terminal (CTF), con ambos fragmentos unidos entre sí de forma no covalente en la membrana celular. Después del corte un agonista interno anclado, también conocido como secuencia de Stachel ubicada en el C-terminal inmediato al GPS, inicia la activación del receptor, a través de los cambios conformacionales causados por la disociación de NTF-CTF (Araç et al., 2012; Langenhan et al., 2016; Nazarko et al., 2018)

El motivo GPS es uno de los dominios autoproteolíticos más extendidos y conservados, desempeñando roles fisiológicos y patológicos para estas proteínas de membrana que lo contienen. El motivo GPS se ha demostrado que es esencial para que las células de Schwann inicien la mielinización (Monk et al., 2009), en la enfermedad renal poliquística autosómica dominante humana 1, se demostró que la escisión es esencial para el funcionamiento normal de la policistina-1 (Qian et al., 2002), mutaciones en este dominio en GPR56 causa microcefalia y afecta el tráfico de esta proteína, y de otras proteínas (Piao et al., 2004), además que se ha corroborado que mutaciones en este dominio están relacionadas con cáncer en tejidos diferentes como: el pulmón, células B del centro germinal, células mieloides, próstata y mama (Kan et al., 2010; Morin et al., 2011) (Kan et al., 2010; Morin et al., 2011), también se ha demostrado que el gen de Lphn3 confiere susceptibilidad al trastorno por déficit de atención / hiperactividad (Arcos-Burgos et al., 2010), a pesar de que se ha estudiado en muchas patologías el mecanismo de autoproteólisis todavía no es claro (Araç et al., 2012).

1.3 Latrofilinas

Las latrofilinas (Lphn) son aGPCR que presentan una arquitectura molecular similar, el extremo NTF este compuesto con: un dominio de lectina (Lec), un dominio de olfactomedina (Olf) (ausente en los invertebrados), una región rica en serina/treonina (STR), un dominio de unión a hormona (HormR), dominio GAIN yuxtamembrana que abarca al sitio GPS siete pases transmembranales, y dominios intracelulares y una cola C-terminal (Langenhan and Schöneberg, 2016; Moreno-Salinas et al., 2019; Sando et al., 2019). La figura 1, ilustra la estructura de Lphns.

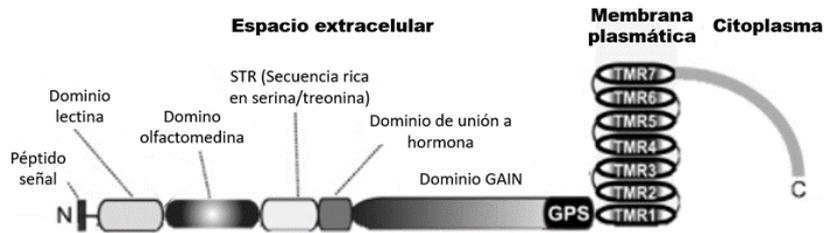


Figura 3. Estructura de Lphn. El NTF de las Lphn está constituido por un dominio de lectina, un dominio de olfactomedina, una región rica en serinas y treoninas, un dominio de unión a hormona y el dominio GAIN con el sitio GPS. Mientras que el CTF por el 7TM y la cola citoplasmática. (Figura tomada de: Boucard et al., 2012).

1.4 Dominios y ligandos de latrofilina

Los ligandos endógenos para latrofilina son: teneurinas (ten 1-4) los primeros ligandos descritos para las latrofilina, las neurexinas (Nrxn 1-3, α y β), las proteínas transmembranales con repetidos ricos en lectina y fibronectina (FLRT 1-3) y las contactinas (Boucard et al., 2012; Moreno-Salinas et al., 2019; O’Sullivan et al., 2012; Silva et al., 2011).

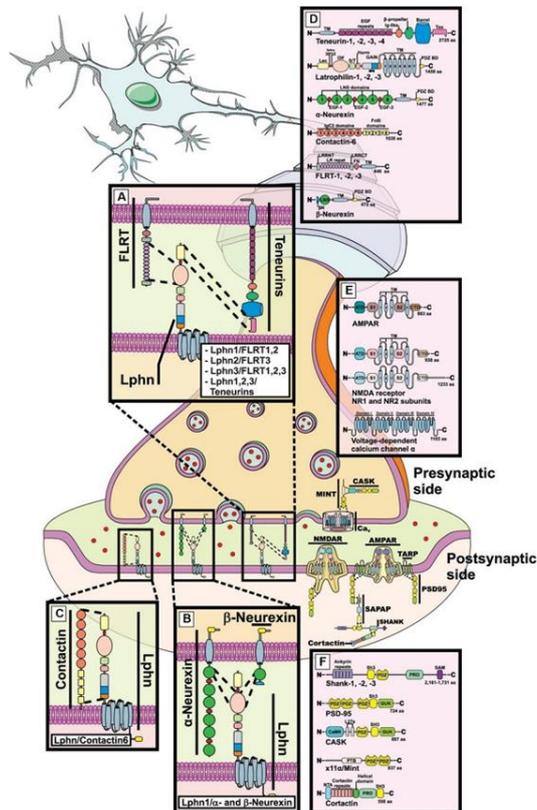


Figura 4. Emparejamiento de latrofilina-ligandos en la sinapsis de los mamíferos. Se muestran los complejos moleculares entre las latrofilinas y los ligandos indicados en recuadros (Figura tomada de: Moreno A. *et. al.* 2019).

Otros ligandos a Lphn son las neurexinas, que solo se ha encontrado en Lphn1, son proteínas de un solo paso transmembranal, pero que se expresan en la membrana presináptica. Las neurexinas son una familia de proteínas del tipo 1 con dos isoformas principales: las isoformas grandes, α -neurexinas, y las isoformas cortas, β -neurexinas. La Lphn1 establece un contacto con las neurexinas a través de ese dominio para estabilizar la adhesión intercelular (Boucard et al., 2012; Moreno-Salinas et al., 2019).

Las FLRTs son proteínas transmembrana ricas en fibronectina y leucina, son proteínas glicosiladas que se localizan en la membrana, tienen alta afinidad para las latrofilinas en los tejidos cerebrales. Esta proteína cuenta con 3 isoformas en vertebrados (FLRT1, 2 y 3), la mayoría de las funciones de FLRT en las neuronas son: participación en eventos de adhesión mediados por contactos homofílicos o eventos de repulsión a través de su interacción heterófila con la familia Unc5 de receptores de membrana que responden a las señales de orientación (Langenhan and Schöneberg, 2016; Moreno-Salinas et al., 2019).

La contactina-6 fue identificada como ligando de la latrofilina 1, esta proteína es parte de las moléculas de adhesión celular de las inmunoglobulinas, la región extracelular de las contactinas está formada por repeticiones similares a las inmunoglobulinas y a la fibronectina. Las contactinas están unidas a la superficie celular a través de un anclaje GPI, una característica que les permite restringir su localización celular a la membrana celular, pero que les impide iniciar de forma autónoma la señalización intracelular (Moreno-Salinas et al., 2019; Zuko et al., 2016). Pese a la alta homología las tres isoformas de Lphn, cada isoforma tiene un patrón de expresión diferencial. La expresión preferida de Lphn1 y Lphn3 es el cerebro, por lo que parece tener un papel importante en este órgano ejecutivo y de toma de decisiones central. Se ha demostrado la expresión Lphn2, es posible detectarlo en corazón, pulmón, riñón y bazo, además del cerebro (Boucard et al., 2014; Meza-Aguilar and Boucard, 2014). Mientras que Lphn1 se ha encontrado en los riñones, los pulmones y el bazo. En cambio, Lphn2 ha exhibido una débil expresión en el cerebro, pero tienen una distribución completa, en el hígado, los pulmones, la placenta, el corazón, los riñones, el páncreas, el bazo y los ovarios, por lo que se

sugiera una función fisiológica generalizada (Boucard et al., 2014; Haitina et al., 2008; Meza-Aguilar and Boucard, 2014; Xing et al., 2009).

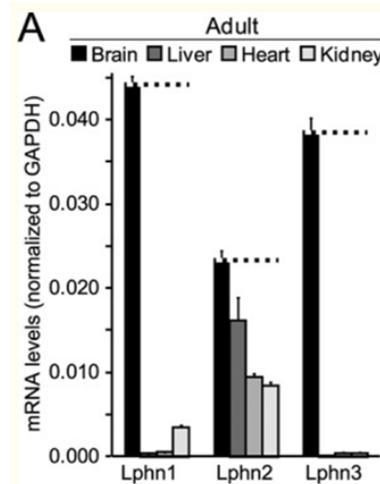


Figura 5. Distribución de Latrofilina en los órganos. Las Lphn1 y Lphn3 se expresan principalmente en el cerebro de forma regulada por el desarrollo, mientras que la lphn2 se expresa de forma heterogénea. (Figura tomada de: Boucard *et. al.* 2014)

Existen trastornos neuronales que se han asociado con defectos en los genes de Latrofilina: TDAH, trastorno por uso de sustancias, trastorno del espectro autista, trastorno bipolar, esquizofrenia, epilepsia y microcefalia. Lphn3 desempeña un papel importante en el desarrollo y/o la regulación de la transmisión monoaminérgica, y en el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) se debe a alteraciones en esta vía (Moreno-Salinas et al., 2019)

1.5 Latrofilina 3

Latrofilina 3 es un aGPCR integrado en complejos trans-sinápticos en regiones del cerebro clave para: el aprendizaje, la memoria, la atención y la actividad (Wang et al., 2021) Se han reportado variantes de Lphn3 están vinculadas en niños y adultos con el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) (Arcos-Burgos et al., 2010; Domené et al., 2011).

Usando biosensores de señalización de proteína G, se ha determinado que Lphn3 se acopla a Gai1, Gai2, Gas, Gaq y Gα13, Y se ha reportado que las variantes de los receptores relacionados con el TDAH carecían constantemente de la eficiencia de acoplamiento de Gα13 intrínseca y dependiente del ligando, mientras que mantenían el acoplamiento inalterado con Gai, Gas y Gaq. De acuerdo con estas alteraciones, las funciones de remodelación de la actina,

así como la señalización de RhoA (Moreno-Salinas et al., 2022). Figura 6. Esquemmatización del acople a proteínas G del receptor Lphn3.

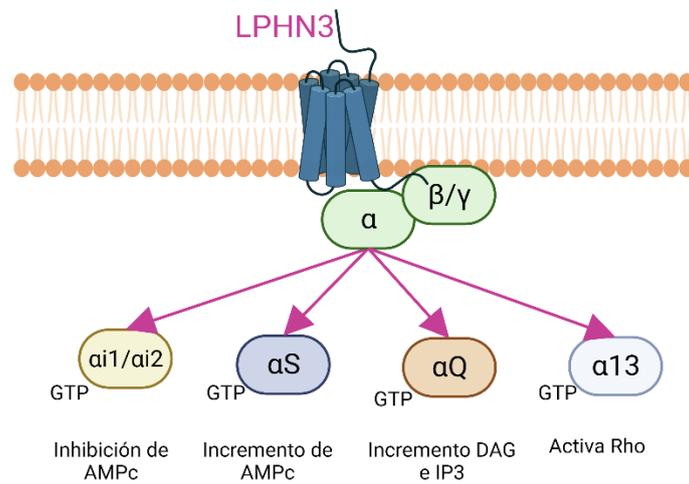


Figura 6. Acople a proteínas G del receptor Lphn3. Esquemmatización del receptor y su acople a proteínas G. (Figura realizada en BioRender).

2. Justificación

La Lphn3 es parte de una familia de GPCRs de adhesión (aGPCRs), que desempeña una función importante en el establecimiento de las sinapsis. El mecanismo de activación de aGPCRs involucra a la función de la secuencia Stachel, la cual debe ser liberada tras un corte proteolítico al sitio GPS. Sin embargo, se desconoce si el proceso de autoproteólisis es esencial para la inducción de mecanismos de señalización intracelular.

Por lo anterior, en este trabajo se plantea usar el receptor latrofilina 3 y una mutación puntual del receptor en su sitio de escisión, comprobar la expresión de este receptor en un sistema heterólogo, realizar ensayos que permitan determinar su perfil de señalización intracelular.

3. Planteamiento del problema.

Aunque investigaciones anteriores han mostrado que en el dominio GAIN incorpora un pliegue autoproteolítico único, no está claro cómo la autoproteólisis participa en el perfil de acoplamiento a proteínas G de Lphn3.

4. Hipótesis.

La autoproteólisis canónica del aGPCR Lphn3 modula su acoplamiento funcional a proteínas G.

5. Objetivos.

5.1 General.

Obtener la mutación en el dominio GPS sitio 869 (Treonina -> Glicina) que inhibe la autoproteólisis de la latrofilina 3 y determinar el perfil de acoplamiento a proteínas G.

5.2 Particulares.

1. Diseñar y generar la construcción plasmídica Lphn3T869G modificando el sitio GPS de Lphn3 utilizando mutagénesis dirigida.
2. Analizar la eficiencia de autoproteólisis y de la expresión del mutante Lphn3T869G en células HEK293T por ensayos de inmunodetección.
3. Evaluar el acoplamiento funcional entre el mutante Lphn3T869G y proteínas G por medio de ensayos de biosensores basados en transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET).

6 Materiales

6.1 Línea celular

Las líneas celulares utilizadas fueron HEK293 y HEK293T. Todas cultivadas bajo condiciones de esterilidad a 37°C y a una atmósfera de 5% de CO₂.

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

6.2 Vector de clonación

PCMV5 fue utilizado como vector de clonación, este plásmido contiene una secuencia de resistencia a ampicilina.

6.3 Cepa bacteriana

Para los procesos clonación y amplificación de cada construcción fueron utilizadas bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) de la cepa DH5 α , la cual presenta el siguiente genotipo: F- 80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 y A1hsdR17 (rk-, mk+) phoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA1.

6.4 Soluciones y Reactivos

Tabla 1. Reactivos empleados.

Solución	Componentes	Características
Medio LB	Bacto triptona 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 10 g. Ajustar pH a 7.0. Aforar a 1 L con agua miliQ. Filtrar y esterilizar en autoclave	Medio de Cultivo para bacterias (4°C)
Solución de lisis 1	50 mM de glucosa, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0, en agua miliQ. Filtrar y esterilizar en autoclave.	Extracción de ADN plasmídico (4°C)
Solución de lisis 2	0.2 N de NaOH, 1% de SDS; en agua miliQ	Extracción de ADN

		plasmídico (22°C).
Solución de lisis 3	3 M de KCH ₃ CO ₂ , 11.5% de ácido acético; en agua miliQ. Filtrar y esterilizar en autoclave.	Extracción de ADN plasmídico (22°C).
Buffer de carga 6X para ADN	0.25% azul de bromofenol, 0.25% xileno cianol, 30% glicerol; en agua miliQ	Electroforesis de ADN (-20°C)
Polietilenglicol 13% wt 8000 #Catálogo P5413	6.5 g de polietilenglicol, 4.67 g de NaCl; en 50 mL agua miliQ.	Purificación de ADN plasmídico (4°C).
Buffer TE	10 mM de Tris pH 8.0, 1 mM de EDTA pH 8.0; en agua miliQ	Disolvente de ADN (22°C)
Buffer TAE 1X	40 mM de Tris-acetato, 1 mM de EDTA; en agua miliQ	Geles de agarosa (22°C)
Solución de losozima		
SYBR® Safe 0.2% LIFE TECHNOLOGIE S Ref S3310	1 µL de SYBR® Safe en 50 mL de buffer de TAE 1X.	Identificación de las bandas de ADN en geles de agarosa (22°C).
Bromuro de Etidio (750 ng/ml)	3 µL (10 mg/mL) en 40 mL agua miliQ.	Identificación de las bandas de ADN en geles de agarosa (22°C)
DMEM 10% con antibiótico	10% de suero fetal bovino (SFB); glutamina 1X; 1% de mezcla de antibióticos (penicilina 10,000	Cultivo celular (4°C).

	U/mL; estreptomicina 10,000 µg/mL) en DMEM basal	
DMEM 20% sin antibiótico	20% de suero fetal bovino; glutamina 2X; en DMEM basal.	Transfección por PEI (4°C).
PBS 1X CORNING Ref 55-031	9.55 g de DPBS en 1 L de agua miliQ. Filtrar y esterilizar.	Cultivo celular (4°C)
Polietilenimina (PEI) 1 mg/mL 25000 monómeros	Polietilenimina 1 mg/mL en PBS 1X. pH 4.5	Transfección por PEI (4°C)
Buffer de carga para electroforesis 1X	50 mM de Tris-HCl pH 6.8, 100 mM de dithiothreitol, 2% de SDS grado electroforético, 0.1% de azul de bromofenol, 10% de glicerol	Electroforesis de proteínas (-20°C).
Buffer de corrida para electroforesis 1X	3.02 g de TRIS-base, 18.8 g de glicina, 10 mL de SDS al 10%, aforar a 1 L con agua miliQ.	Electroforesis de proteínas (22°C)
Buffer de transferencia 1X	3.03 g de Tris base, 14.4 g de glicina, 200 mL de metanol, 25 mL de SDS pH 7.4. Ajustar el volumen a 1 L con agua destilada	Western Blot (4°C).
Rojo de Ponceau P3504 Sigma-Aldrich	0.5 g rojo ponceau en 500 mL ácido acético 5%	Western Blot (4°C).
TBST 1X	5 mL de TRIS-HCl 1 M pH 8.0, 4.38 g de NaCl, 0.25 mL de Tween20. Completar a 500 mL con agua miliQ	Western Blot (4°C).
BSA 3% en TBST Sigma #Catálogo A-4503	0.75 g de BSA en 25 mL de TBST	Western Blot (4°C).

Inhibidor de proteasas 1X Roche Ref 11836145001	1 pastilla de inhibidores en 1 mL de agua miliQ.	Western Blot (4°C).
Buffer BRET 10X	2.38 g de Hepes, 0.147 g de CaCl ₂ , 0.101 g de MgCl ₂ , 0.313 g de KCl, 8.53 g de NaCl, 0.99 g de Glucosa, en 100 ml de Agua miliQ	BRET
Diluyente	0.876 g de NaCl en 100 mL de Agua	BRET
Colenterazina 50 X Invitrogen #Catalogo C2944	55 ul de stock 50X y 1045 ul de buffer BRET 1X	BRET
BSA 3% en PBS 1X Biowest #Catálogo P6154	0.75 g de BSA en 25 mL de PBS 1X	Solución Anticuerpos

6.5 Anticuerpos

Tabla 2. Anticuerpos.

Reactivos	Compañía	Características
Anti-FLAG	Policlonal hecho en conejo clase IgG #Catalogo: E7425-.2MG	Western Blot
Anti-HA	Policlonal hecho en raton clase IgG #Catalogo: 16B12	Western Blot
Anti-conejo	IRDye 680D policlonal hecho en cabra clase IgG. LI-COR #Catálogo: 926-68071 Longitud de onda de excitación: 676 Longitud de onda de emisión: 694	Western Blot
Anti-ratón	IRDye 800CW policlonal hecho en burro clase IgG. LI-COR #Catálogo: 926-32212. Longitud de onda de excitación: 778 Longitud de onda de emisión: 795	Western Blot

Anti-conejo- HRP	Peroxidasa conjugada con Anti-rabbit IgG (H+L) Affini Pure Goat. (Jackson ImmunoResearch # Catálogo: 145679)	Ensayo de DESC
Anti-tubulina	Monoclonal hecho en ratón clase IgG #Catalogo: 12G_10 (DSHB)	Western Blot

6.6 Enzimas

Tabla 3. Enzimas y sustratos

Reactivos	Compañía	Características
Taq Polimerasa	PrimeSTAR HS ADN polimerasa de alta fidelidad (TaKaRa #Catálogo: R010A).	PCR
Ligasa	T4 ADN ligasa (Promega #Catálogo: M1801)	Ligación
EcoRV	Secuencia de corte: 5' GAT/ATC 3' (Promega #Catálogo: R635A)	Digestión con enzimas de restricción
EcoRI	Secuencia de corte: 5' GAATTC 3' (Promega #Catálogo: R6011)	Digestión con enzimas de restricción
BamH1	Secuencia de corte: 5' GGATCC 3' (Promega #Catálogo: R6021)	Digestión con enzimas de restricción
Bsu36I	Secuencia de corte: 5' CC/TNAGG 3' (BioLabs # Catalogo: R0524S)	Digestión con enzimas de restricción

7 Métodos

7.1 Estrategia experimental

La metodología se basa en lograr tres objetivos: generación de la mutante no escindible Lphn3T869G^{HA-FLAG}, expresión de la mutante Lphn3T869G^{HA-FLAG} en células HEK293T y análisis de acoplamiento a proteínas G usando biosensores. La figura 7, muestra la línea de trabajo a seguir.

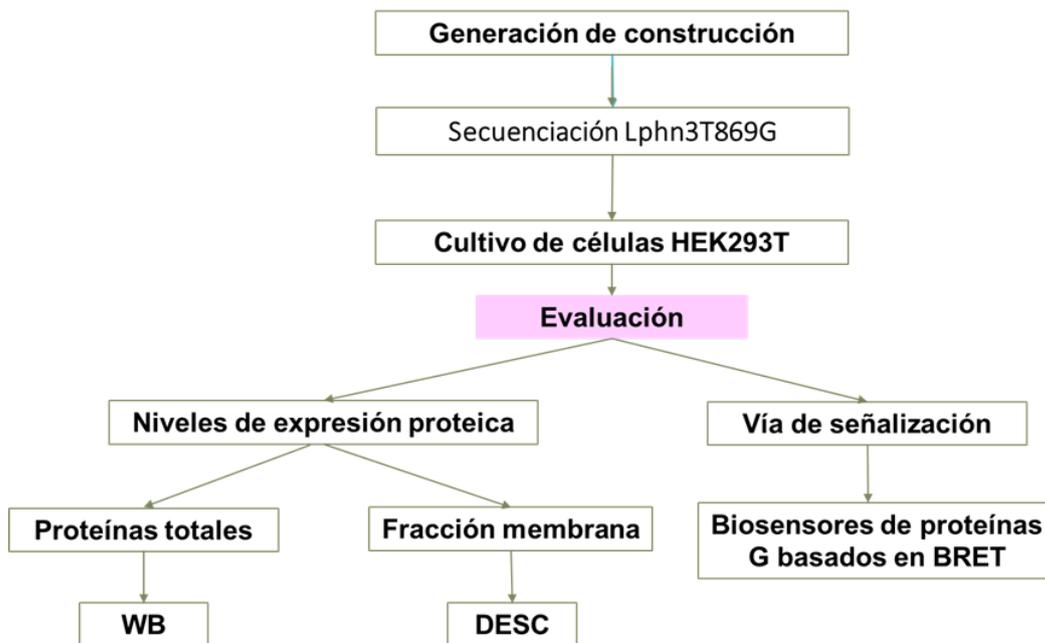


Figura 7. Diagrama de trabajo

7.2 Generación de la mutante pCMV- Lphn3T869G^{HA-FLAG}

Con el objetivo de obtener la mutación en el dominio GPS sitio 869 sustituyendo una Treonina por una Glicina (HLT↓G), cambio que provoca la inhibición de la autoproteólisis de la latrofilina 3, se empleó el método de mutagénesis por PCR de extensión sobrepuesta y un plásmido previamente diseñado pCMV-Lphn3T869G^{HA-FLAG} el cual codifica por la latrofilina-3 humana con etiqueta de Flag al extremo N-terminal y etiqueta de HA en la primera asa extracelular. El fundamento de esta técnica consiste en 2 pasos para generar fragmentos de reacciones de PCR para lo cual se empleó la ADN polimerasa PRIMESTAR utilizando como cadena molde la secuencia de ADN de tipo silvestre del gen Lphn3.

Paso 1; se utiliza la reacción de PCR para generar 2 fragmentos que contienen una región que se superponen en el extremo 3' del fragmento 1 (F1) y en el extremo 5' del fragmento 2 (F2). Estos 2 primeros fragmentos son un inserto lineal con secuencias del plásmido en ambos extremos.

Paso 2; el fragmento 1 y el fragmento 2 se utilizan para una tercera reacción de PCR sobrepuesta que fusionará ambos fragmentos en una secuencia de longitud completa, generando el fragmento 3 (F3) que será amplificado, produciendo un ADN fusionado.

Para la realización de esta metodología primero se diseñaron los oligonucleótidos en el programa Serial Cloner, se utilizó el vector pCMV-Lphn3, construcción diseñada previamente con etiquetas FLAG y HA, y con secuencia de resistencia a penicilina, como base para el diseño de oligonucleótidos. En la tabla 4, se muestran los oligonucleótidos diseñados: PL21001, PL21002 y PL21003, y también un oligonucleótido diseñado previamente: AL16001.

Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados para la extensión sobrepuesta.

Oligo	Secuencia	Tm (C°)	Sentido	No. bases
PL21001	GTAATCACCTG GGAA ACTTTGCTGTC	66.3	For	26
PL21002	GACAGCAAAGTT TCCC AGGTGATTAC	66.3	Rev	26
PL21003	CCCTCTATCAATGATCTGCAC	59.4	Rev	21
AL16001	GTGAACCGTCAGAATTCATG	60.6	For	20

Secuencia de nucleótidos que ha sido modificado.

La tabla 5, muestra cómo se combinarán los oligonucleótidos para la obtención de los tres fragmentos en la PCR sobrepuesta.

Tabla 5. Combinación de oligonucleótidos para generación de fragmentos.

Fragmentos	Tamaño fragmento	Oligonucleótidos
F1	1217 pb	PL21001 – PL21003
F2	2633 pb	AL16001 – PL21002
F3	3824 pb	AL16001 – PL21003

La figura 8, se muestra una esquematización de la generación de los 3 fragmentos por PCR sobrepuesta.

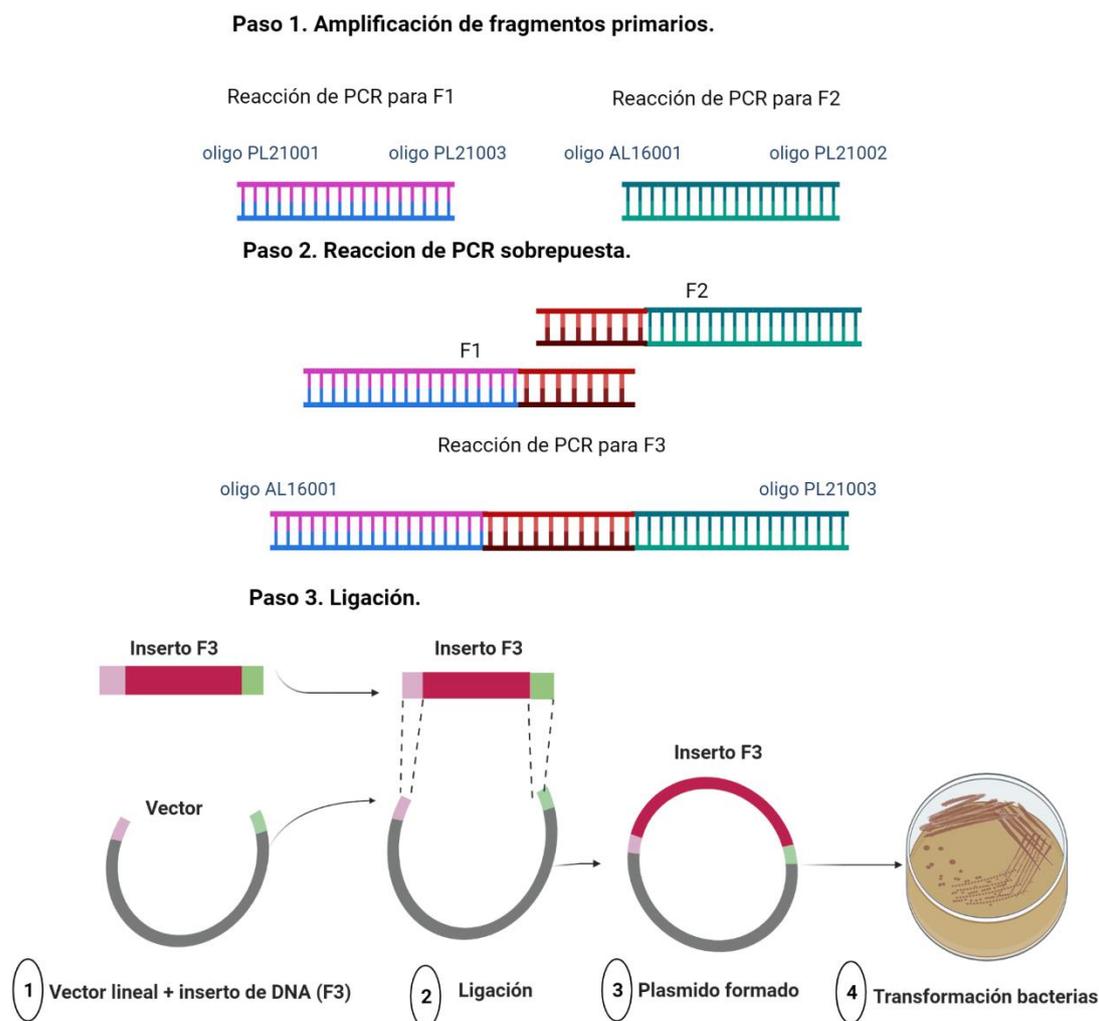


Figura 8. Esquema de la elaboración de la PCR sobrepuesta.

Los componentes de mezcla de las reacciones de PCR para la generación de los fragmentos individuales (F1, F2 y F3) se muestran en la tabla 6, y las condiciones en las que se desarrolló la reacción se encuentran en la tabla 7.

Tabla 6. Contenido de la reacción de PCR para fragmentos individuales.

Reactivos	Concentración	Vol (µl)
Agua miliQ		14.55
Buffer 5x	5 X	5
dNTPs	2 mM	2
ADN molde	10 ng/µl para generar fragmento 1 y 2	1

	5 ng/μl para generar fragmento 3	
Oligo sentido	10 μM	0.5
Oligo antisentido	10 μM	0.5
DMSO		1.25
Polimerasa PRIMESTAR		0.2

Tabla 7. Condiciones de la PCR, en Termociclador marca BioRad T100™.

Etapa	Temperatura (° C)	Duración	Ciclos
Desnaturalización inicial	98	3 min	1 X
Desnaturalización	98	10 seg	30 X
Hibridación	55	5 seg	
Elongación	66.3	1:20 min. (fragmento 1) 2:30 min (fragmento 2) 4 min. (fragmento 3)	
Elongación final	66.3	7 min	1 X
Terminación	4		

7.3 Ligación del fragmento 3 con el vector

El F3 final tiene sitios de enzimas de restricción: EcoRI y Bsu36I en ambos extremos, por lo que se realizó una reacción de digestión para el F3. El producto de esta digestión se usó como inserto en el plásmido vector pCMV en una reacción de ligación, para formar un nuevo plásmido de doble cadena. Las condiciones empleadas para la reacción de digestión son mostradas en las Tabla 8.

Tabla 8. Restricción del inserto y del vector.

Reactivos	Concentración	Vol (μl)
Agua miliQ		8.5
BSA	1X	1
Buffer E	2 mM	2
ADN	100 ng/μL	4.5
EcoR1		2 (1 cada hora y media)

Bsu36I		2 (1 cada hora y media)
	Total	20
3 hrs. a 37 °C		

Para la reacción de ligación se utilizó la relación vector: inserto, 1:3.

Empleamos 50 ng del vector y utilizamos la fórmula mostrada a continuación para calcular los nanogramos del inserto a utilizar.

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

ng vector: nanogramos del vector

ng inserto: nanogramos del inserto

Kb vector: kilobases del vector

Kb inserto: kilobases del inserto

x: número de veces del vector

y: número de veces del inserto

La relación vector: inserto fue puesta en una reacción de ligación cuyos componentes se muestran en las Tabla 9. La mezcla fue incubada a 16°C por 16 horas. El control negativo (reacción sin inserto) y el control positivo (reacción con Lphn3), de la reacción de ligación se realizó en el mismo tiempo y bajo las mismas condiciones de la muestra mutante.

Tabla 9. Condiciones de la ligación.

Reactivos	Cantidad 1:3	+	-
Agua	4	6.29	7
Vector cortado (50 ng)	1	1	1
Fragmento 3 (35.9 ng)	3	0.71	0
Buffer ligasa	1	1	1
Ligasa T4	1	1	1

Para confirmar que la mutante se generó se usaron dos metodologías: la primera, una restricción usando las endonucleasas EcoRV y BamH y la segunda, secuenciación.

7.4 Transformación de la construcción generada en bacterias competentes

Una vez concluida la reacción de ligación se procedió a insertar el ADN de la construcción generada, $Lphn3^{T869G}$, en bacterias competentes. Dos alícuotas de bacterias competentes DH5 α ($\approx 200 \mu\text{L}$) fueron descongeladas en hielo-agua. Posteriormente le fue adicionado a una alícuota de bacteria la mezcla completa de la ligación problema y a la otra la mezcla completa de la ligación control (-). Ambos viales fueron mantenidos por 30 min en hielo-agua. Pasado este tiempo se incubaron a 42°C por aproximadamente 1 min. Rápidamente fueron transferidos a un baño de hielo-agua para generar choque térmico por 2 min. A las alícuotas de bacterias, les fueron agregados $800 \mu\text{L}$ de medio LB estéril atemperado sin antibiótico y posteriormente incubadas a 37°C durante 1 hora con agitación (220 rpm). Pasado este tiempo, las alícuotas de bacterias transformadas (con el ADN) fueron concentradas a $\approx 10\,000$ gravedades por un min a 22°C y la pastilla obtenida fue re-suspendida en $100 \mu\text{L}$ de medio LB. Las bacterias fueron sembradas por el método de inoculación por extensión en placas de medio LB con ampicilina [$100 \mu\text{g}/\mu\text{L}$]. Por último, las placas fueron incubadas a 37°C durante 16 horas.

Después de la transformación de bacterias se seleccionaron las colonias bacterianas y se realizó la amplificación de estas por cultivo bacteriano usando medio LB. Para posteriormente realizar una extracción de ADN de estas usando la técnica Miniprep-lisis alcalina.

7.5 Miniprep y digestión con endonucleasas

Tres colonias al azar fueron seleccionadas de cada placa de medio LB con ampicilina [$100 \mu\text{g}/\mu\text{L}$]. Cada colonia fue sembrada en tubos de ensayos que contenían 2 mL de medio LB más ampicilina [$100 \mu\text{g}/\mu\text{L}$] por 8 horas a 37°C con agitación (220 rpm). Se centrifugó la suspensión de bacterias a 4°C por 2 min a 12,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla de bacterias obtenida se disolvió en $100 \mu\text{l}$ de la solución I fría. Se adicionaron $200 \mu\text{l}$ de cloroformo, seguido de $150 \mu\text{l}$ de solución III, se mezcló por inversión y se incubó por 5 min en hielo, se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min a 4°C . Se transfirieron $400 \mu\text{l}$ del sobrenadante a un tubo limpio y se adicionaron $800 \mu\text{l}$ de etanol absoluto, mezclando por agitación e incubando por 2 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min a 4°C , se eliminó el sobrenadante y se adicionó 1 ml de etanol frío, se decantó y se mantuvo el tubo abierto por 5 min para permitir la evaporación total del etanol. Finalmente se adicionaron $50 \mu\text{l}$ de solución amortiguadora TE (pH 8.0) conteniendo RNAasa (10X).

El ADN plasmídico obtenido se colocó en una reacción con la endonucleasa BamHI. Y EcoRV. Los componentes de esta reacción son mostrados en la Tabla 10. Posteriormente, los resultados de la restricción fueron corridos en un gel de agarosa al 0.8% por 45 min a 80 volts. El gel fue

incubado por 30 min con solución de bromuro de etidio para visualizar el patrón de corte. Los ADNs plasmídicos que cumplieron correctamente con el patrón de corte fueron guardados y uno de ellos escogidos para su posterior amplificación.

Tabla 10. Condiciones de la comprobación por endonucleasas.

Reactivos	Concentración	Vol (µl)
Agua miliQ		12
BSA	1X	2
Buffer multicore	2 mM	2
ADN	1 µg/µL	2
EcoRV y BamHI		1 c/u
	Total	20
3 hrs. a 37 °C		

7.6 Midiprep

De las colonias seleccionadas en midiprep, se inocularon en 2 mL de medio LB con 100 µg/mL de ampicilina y después de 8 horas de incubación fue sembrado un volumen de 100 µL de bacterias en un matraz que contenía 100 mL de medio LB con ampicilina. El cultivo fue crecido a 37°C durante 16 horas a 220 rpm.

Los cultivos bacterianos de midiprep se colocaron en tubos de 50 mL y fueron centrifugados a 4,500 rpm por 25 minutos. Las pastillas bacterianas obtenidas fueron resuspendidas en 2 mL de solución de lisis 1 con ayuda del vórtex. A continuación, se agregaron 300 µL de solución de lisozima y después 4 mL de solución 2, los componentes fueron mezclados por inversión de los tubos y la mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 4 mL de cloroformo, 2 mL de solución 3 y después de mezclar el contenido, los tubos se dejaron en reposo durante 10 minutos en hielo. Se realizó una centrifugación a 4,500 rpm durante 12 minutos a 4 °C, el sobrenadante fue transferido a otro tubo de 50 mL y se le adicionaron 0.6 volúmenes de isopropanol. Después de mezclar bien el contenido, los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y posteriormente fueron centrifugados 12 minutos a 4,500 rpm. La pastilla obtenida fue lavada con 2 mL de etanol al 70 % y fue disuelta en 500 µL de buffer TE.

A cada muestra de ADNp (500 µL) se le adicionó un volumen igual de LiCl 5M para precipitar el ARN. Se realizó una centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue transferido a otro tubo y se le agregó 1 mL de isopropanol, después de mezclar los componentes, los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados por 10 minutos a 13,000 rpm. La pastilla obtenida fue lavada con 1 mL etanol al 70% y disuelta en 500 µL de buffer TE que contenía 20 µg/mL de RNAsa. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente fueron adicionados 500 µL de una solución de polietilenglicol (PEG wt 8,000) y nuevamente se realizó una incubación, esta vez a -20 °C durante 20 minutos. Los tubos fueron centrifugados a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, el sobrenadante fue recuperado y se le añadieron 120 µL de acetato de amonio 10M. Una vez mezclados los componentes se agregó 1 mL de etanol absoluto y los tubos se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizó una centrifugación final de 12 minutos a 13,000 rpm, la pastilla resultante fue lavada con 1 mL de etanol al 70% y disuelta en 200 µL de buffer TE.

7.7 Secuenciación

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

7.8 Transfección por polietilenimina (PEI)

Para evaluar la expresión de la mutante se empleó la línea celular HEK-293T, derivadas de riñón embrionario y de origen humano. Ambas líneas celulares presentan morfología epitelial, las células HEK-293T contienen el antígeno T del virus SV40 lo que incrementa su eficiencia para transfección de ADN plasmídico, además de tener un nivel elevado de adherencia celular comparado con las HEK-293. La línea celular será cultivada bajo condiciones de esterilidad a 37°C y bajo una atmósfera de 5 % de CO₂.

El fundamento de la técnica consiste en que las células HEK293T se utilizaron para transfección por polietilenimina (PEI), así el ADN plasmídico puede introducirse en una célula HEK293T. La PEI condensa el ADN en partículas cargadas positivamente que se unen a las superficies celulares aniónicas. En consecuencia, el complejo ADN: PEI es endocitado por las células y el ADN se libera en el citoplasma.

Siendo la metodología la siguiente: una vez obtenido el ADN se procedió a trabajar en la línea celular mencionada anteriormente. El procedimiento de transfección utilizado en el laboratorio

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

7.9 Extracción de proteínas totales

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

7.10 Western blot

Para conocer la expresión de la mutante se realizó un Western Blot (WB), método que implica el uso de electroforesis en gel para separar las proteínas de la muestra. Las proteínas separadas se transfieren del gel a la superficie de una membrana de nitrocelulosa. La membrana se expone a un anticuerpo específico contra la proteína en estudio, este caso se usarán anticuerpos para las etiquetas de la mutante que son anti-HA y anti-FLAG, y para el control de carga anti-tubulina.

Las proteínas extraídas con buffer de carga fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 8%, el cual fue hecho según las indicaciones del Molecular Cloning A Laboratory Manual. Posteriormente las muestras fueron corridas en el gel concentrador, por 20 min a 80 volts y pasado este tiempo, en el gel separador por 90 min a 120 volts. Una vez terminada la corrida se realizó la transferencia en cámara húmeda por tres horas a 250 mA o por 16 horas a 35 volts en una membrana de nitrocelulosa. El tiempo de transferencia escogido dependió de las

características de la proteína a transferir. Seguidamente la membrana se tiñó por 3 min con rojo de Ponceau y se lavó tres veces con TBST por 10 min. La membrana fue bloqueada por dos horas con BSA al 3% en TBST 1X. Luego la membrana, fue lavada tres veces con TBST por 10 min y se incubó con el anticuerpo primario correspondiente, dilución 1:1000 en solución de bloqueo, por 24 horas a 4°C. Terminado el tiempo de incubación se realizaron tres lavados con TBST por 10 min. La membrana fue lavada tres veces con TBST por 10 min. Las bandas fueron reveladas en el equipo LI-COR Biosciences Odyssey Fc con un tiempo promedio de exposición de 3 min. El marcador fue visualizado por el canal de 700 para detectar al anticuerpo secundario IRDye700 que reconoce a anti-Flag y canal de 800 para detectar al anticuerpo secundario IRDye 800 que reconoce a anti-HA y a anti-tubulina.

En la figura 9, se muestra una esquematización de los pasos a seguir para realizar la técnica de WB.

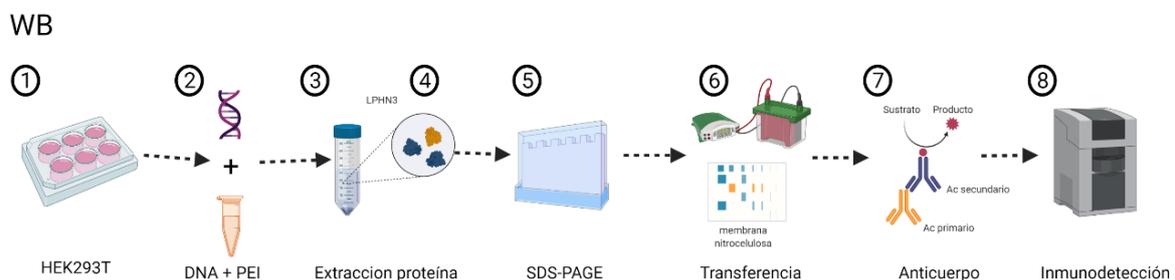


Figura 9. Representación de los pasos para elaboración de WB.

7.11 Detección de expresión de superficie celular (DESC)

Para la detección de la expresión del receptor en la superficie celular (DESC), se emplearán las células HEK293T, en placas de 6 pozos al 90% de confluencia y dejar crecer durante 24 horas en la placa de 6 pozos. Después de 24 horas de haber sembrado la placa, se procedió a realizar el proceso de transfección con los plásmidos deseados. Se realizó la preparación de la placa de 96 pozos 24 horas antes, poniendo poli L lisina al 1% (50 uL por pozo). Al cumplir 16 horas de transfección, se lavaron las células y se resembraron en una placa de 96 pozos para ello se realizó lo siguiente: se retiró de la placa de 96 pozos la poli L lisina y se lavó dos veces con PBS. Enseguida se realizó un primer lavado con PBS 1X a las células transfectadas. Se colocó 250 uL de tripsina y se dejan incubar por 2 min, enseguida se agregó 750 uL de DMEM al 10% de SFB. Se re suspendió cuidadosamente, de esta primer alícuota se tomaron 400 uL y se pusieron en un tubo nuevo, este fue diluida por segunda vez con 600 uL de DMEM 10% de

SFB. Se re suspendió las células y se toma 120 μ l de esta segunda mezcla para ponerlas en la placa de 96 pozos. Después de 48 horas post-transfección, se sacó la placa y se retiró el medio con la pipeta de 200 μ l y hacer un lavado con PBS a TA. Se procedió a realizar la fijación con paraformaldehído 4% a 4°C (PFA) por 10 minutos (100 μ l por pozo), seguido de colocar placa en agua hielo. Las células fijadas se lavaron 2 veces con PBS 1X a 4°C y realizó una incubación con PBS1X + BSA3%+ azida al 0.1% por una hora. Al finalizar la hora, se procedió a colocar el anticuerpo anti-FLAG (1/5,000) por 2 horas. Pasadas las 2 horas se realizaron 2 lavados en solución de bloqueo sin azida (PBS +BSA) 100 μ l. Después se colocó el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano en una dilución 1/7,000 por 1 hora (anti-conejo-HRP (Flag)), seguido se realizó un lavado con solución de bloqueo y 2 lavados con PBS 1X. Para la reacción colorimétrica se agregaron 100 μ l de sustrato de peroxidasa de rábano y se realizaron lecturas de absorbancia a 650 nm por 30 minutos con agitación constante.

En la figura 10, se muestra una esquematización de los pasos a seguir para realizar la técnica de DECS.

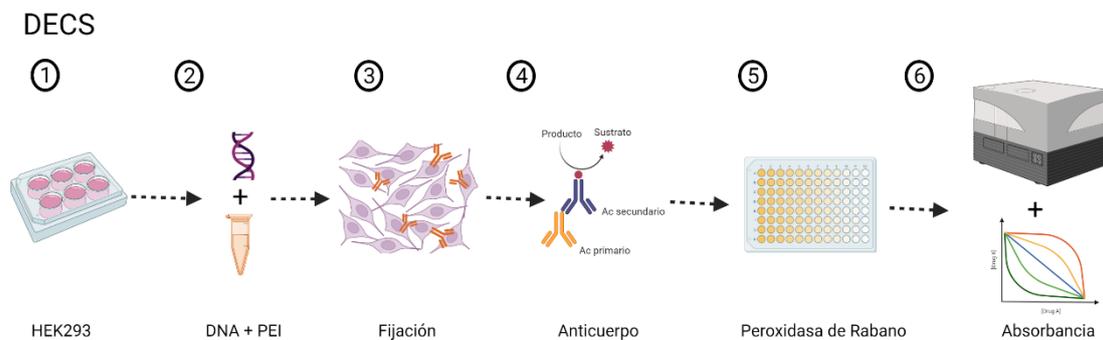


Figura 10. Representación de los pasos para elaboración de WB.

7.12 Perfil de señalización

Para el estudio del perfil de señalización utilizaremos la técnica de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET). Para esta metodología se usarán los biosensores TRUPATH (Addgene, plasmid kit #1000000163) de las subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$ que permitiría realizar mediciones de la señalización de la proteína G en tiempo real. Las proteínas donantes quiméricas $G\alpha$ -RLuc8 y las proteínas aceptoras $G\gamma$ -GFP2, se diferenciarán entre proteínas inactivas (asociación de los trímeros $G\alpha\beta\gamma$) y activa (disociación de los trímeros $G\alpha\beta\gamma$) con la disminución de la señal bioluminiscente. La eficiencia de la transferencia de

energía de resonancia entre las proteínas donantes y las receptoras depende de la proximidad y de la orientación (Olsen et al., 2020).

Los pasos importantes de la técnica son tres: 1), Transfección, para la formación de los complejos de transfección se realizaron los cálculos correspondientes. Colocando las concentraciones indicadas en un volumen final de 100 μ l. Concentraciones usadas para la formación de complejo se encuentra en la tabla 11.

Tabla 11. Complejos de transfección BRET.

Componente	Concentración	Cantidad			
		0 ng receptor	250 ng receptor	500 ng receptor	750 ng receptor
Diluyente NaCl	150 mM	92 μ L	88 μ L	83 μ L	79 μ L
G α Rluc8	10 ng/ μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L
G β 3	10 ng/ μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L
G γ GFP2	10ng/ μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L
PCMV (vector vacío)	500 ng/ μ L	1.94 μ L	1.44 μ L	0.94 μ L	0.44 μ L
ADN de Receptor	50 ng/ μ L	0 μ L	5 μ L	10 μ L	15 μ L
PEI (1:3)	1 mg/ml	3 μ L	3 μ L	3 μ L	3 μ L

Durante el tiempo de incubación con PEI, se cuantificaron las células que se emplearon usando el equipo Corning® Cell Counter (# Catalogo 6749). Transcurrido el tiempo de incubación, para cada tubo que contiene 100 μ l de complejo se completa a un volumen de 1 ml conteniendo 3.5×10^5 células. Se colocó 100 μ l de la mezcla complejo ADN/células en cada pozo de placas de 96 pozos para BRET (se repitió en 3 pozos para cada concentración de ADN). 2) Se colocó las placas en la incubadora por 48 para posteriormente realizar la lectura. 3) Lectura, Primero se preparar el BRET buffer a temperatura ambiente. Se retiró el medio de las células y se realizó un lavado con 90 μ l de BRET buffer para quitar el resto de medio, seguido se colocó 90 μ l de BRET buffer y se dejó incubar por 1h para permitir que las células alcanzaran la temperatura de equilibrio. En ese tiempo se incubación se preparó el volumen necesario de colenterazina a una concentración final de 5 μ M (55 μ l colenterazina 50X y 1045 Buffer BRET). Al final se realizará la lectura en el Cytation 5 (serie 1911301) y se realizó el análisis correspondiente de los datos. La tabla 12, muestra las condiciones usadas para la lectura de BRET en el equipo Cytation 5.

Tabla 12. Condiciones de la lectura de BRET en Cytation 5.

Etapa	Duración
1 Agitación doble orbital	10 segundos
2 Incubación	4.5 minutos
3 Lectura 1 (BRET2 410/80)	100 milisegundos
4 Lectura 2 (BRET2 515/30)	100 milisegundos
Temperatura 24.4 °C	

La interpretación de los datos se realiza por BRET 2 radio e índice BRET inverso (iBRET), para obtener BRET2 radio se calculó la relación entre la emisión de fluorescencia del aceptor GFP2 (515/40 nm) y la emisión de luminiscencia del donante Ruc8 (410/80 nm). También se implementó un índice iBRET de la siguiente manera para acoplar valores de índice crecientes a perfiles de activación crecientes de los biosensores: $BRET(0)/BRET(x)$, donde las variables representan la señal de relación BRET en 0 y en x ng del ADN del plásmido receptor, respectivamente, lo que indica activación cuando los valores muestran una significación superior a 1. El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism versión 6.0 utilizando ANOVA bidireccional seguido de una prueba de Sidak. La figura 11, muestras el fundamento para esta técnica y los pasos de la metodología.

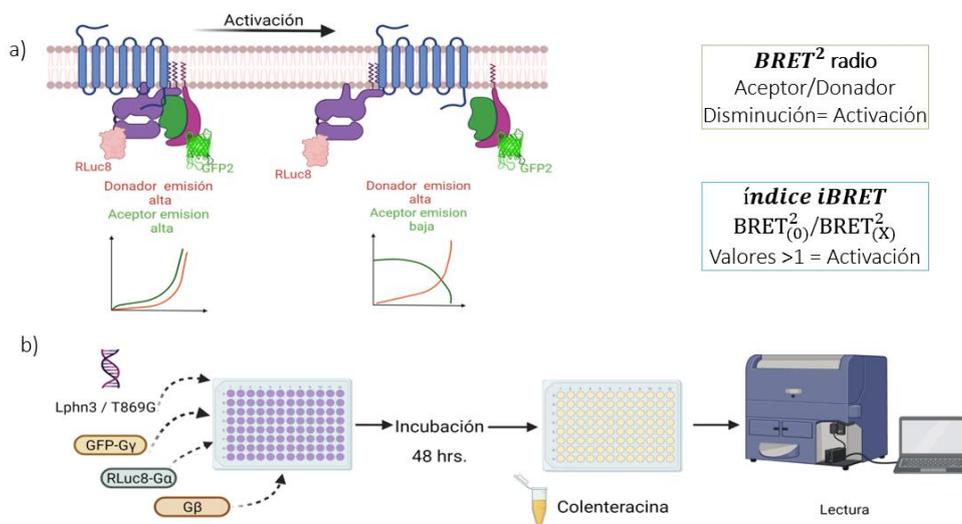


Figura 11. Esquematación del fundamento de BRET en panel a) y metodología de BRET por realizar en panel b).

8 Resultados

8.1 Generación de Fragmentos en PCR sobrelapada.

Para generar la mutación de la treonina en la posición 869 de la LphnG por una glicina, se llevó a cabo la técnica por PCR de extensión sobrepuesta. Esta técnica consiste en dos etapas: Etapa 1. Realizar dos fragmentos individuales cada uno llevando la mutación sitio-dirigida en la región de sobrelapado mediante dos reacciones de PCR independientes; Etapa 2. Realizar una tercera reacción para la sobreposición de los fragmentos (F1 y F2). De esta manera, los fragmentos individuales de 1217 pb y 2633 pb (Figura 12) fueron ensamblados para formar un amplicón de 3824 pb del gen Lphn3 FLAG y HA, conteniendo la mutación de treonina insertada en la posición 869.

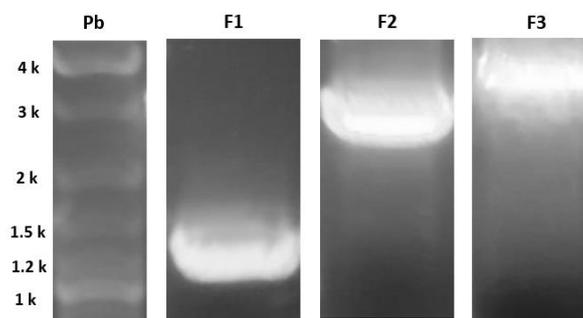


Figura 12. Corrimiento electroforético para fragmentos de PCR sobrelapada. Gel de electroforesis del fragmento 1 (F1) y fragmento 2 (F2). Los tamaños esperados son: 1217 pb para el fragmento 1, 2633 pb para el fragmento 2 y 3824 pb para el Fragmento 3 (F3).

8.2 Digestión con endonucleasas del plásmido Lphn3^{T869G}

Tanto el amplicón del fragmento 3 y el vector pCMV-Lphn3, se restringieron empleando las enzimas Bsu36I y EcoRI, y posteriormente se llevó a cabo una reacción de ligación, a fin de introducir el amplicón conteniendo la mutación T869G en la secuencia correspondiente de Lphn3. (Figura 13).

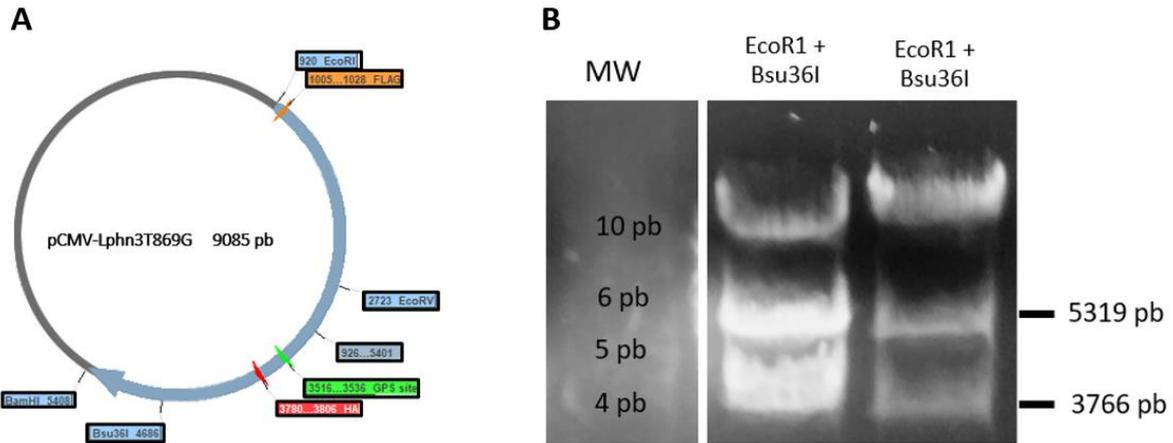


Figura 13. Digestión con endonucleasas de plásmido. A) Mapa del vector pCMVLphn3T869G que muestra el sitio de FLAG, HA y el sitio GPS B) Patrón de bandas obtenidos de la digestión del vector pCMV-Lphn3T869G con EcoRI y Bsu36I tamaños esperados de 5319 pb y 3766 pb.

8.3 Transformación de bacterias y amplificación

Bacterias competentes *E.coli* DH5 α fueron transformadas con la reacción de ligación, se crecieron y se hizo una selección de las colonias que presumiblemente incorporaron el plásmido deseado, para hacer extracción de ADN plasmídico (ADNp) de dichas colonias. El ADNp se sometió a una reacción de restricción empleando las enzimas EcoRV y BamHI para distinguir cuales plásmidos contenían el amplicón insertado en orientación correcta. La figura 14 y figura 15 muestran los resultados de la ligación y la amplificación del ADN. La figura 16, indica el patrón de banda generado usando las endonucleasas EcoRV y BamHI, para confirmar la inserción correcta del fragmento 3 y obtenido de las colonias seleccionadas, comprobando de esta manera que el ADNp corresponde al vector pCMV- Lphn3T869G^{HA-FLAG}, los fragmentos generados son 2 fragmentos de: 6402pb y 2683 pb.

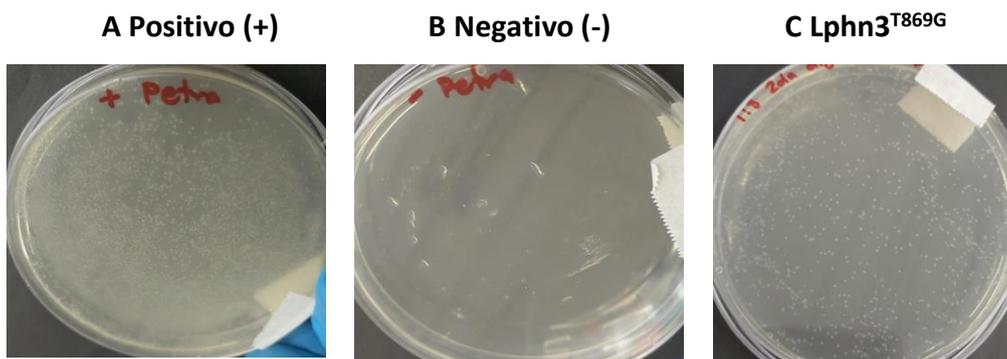


Figura 14. Crecimiento de bacterias transformadas. Los productos de ligación se usaron para transformar bacterias competentes y crecidas en placas, encontrando gran cantidad de UFCs (Unidades Formadoras de Colonias) en las placas de las ligaciones problema en comparación con el control, a las 16 horas de incubación. También se muestra que, para la mayoría de las reacciones de ligación, la relación vector/inserto que mejor funcionó fue 1:3. Resultados de la transformación bacteriana utilizando el producto de ligación tras el sembrado en medio LB agar con ampicilina, A) Resultados del control positivo de la ligación, transformación de Lphn3 silvestre, se observa mucho crecimiento bacteriano, B) control negativo de la ligación, vector sin inserto, no se observa crecimiento bacteriano C) resultados de la ligación de la mutante, fragmento 3, como inserto en el vector pCMV, se observa crecimiento bacteriano.

A 2 mL de medio LB + Amp



B 100 mL de medio LB + Amp

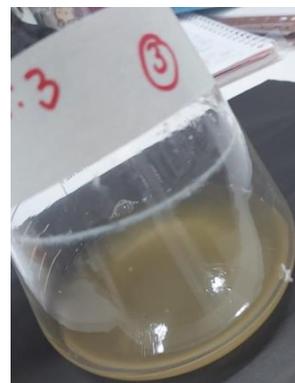


Figura 15. Amplificación de ADN mutante. La amplificación se realizó en bacterias *E. coli*, A) usando 2 mL de medio LB con ampicilina por 8 horas y posteriormente, B) se crecieron en 100 mL de medio LB con ampicilina, en ambos se observa la presencia de crecimiento bacteriano.

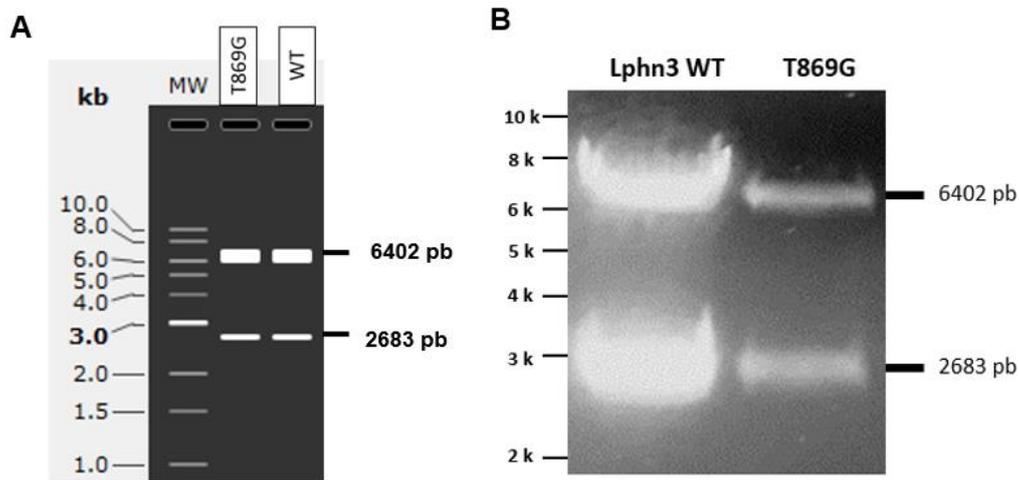


Figura 16. Corte con endonucleasas de la variante Lphn3T869G. a) Patrón de bandas obtenidos de la digestión in silico de vector pCMV-Lphn3^{HA-FLAG} y pCMV-Lphn3T869G^{HA-FLAG} con EcoRV y BamHI. b) Patrón de bandas obtenido de la digestión de pCMV-Lphn3 y pCMV-Lphn3T869G, imagen muestra el corrimiento electroforético de ADN.

8.4 Secuenciación

Una vez verificado el ADN plasmídico que se obtuvo, el mismo fue secuenciado con el oligonucleótido sentido AL160007 que se hibridó en pCMV-Lphn3T869G^{HA-FLAG}. Los resultados de la secuenciación fueron alineados y comparados con el mapa de pCMV-Lphn3^{HA-FLAG} en la figura 17 se muestra el espectro, así como la coincidencia entre las secuencias comparadas corroborando la fidelidad de la secuencia original, además de la sustitución correcta de los nucleótidos para dar origen al cambio de aminoácido, en este caso fue una treonina (GGA) por una glicina (ACC).

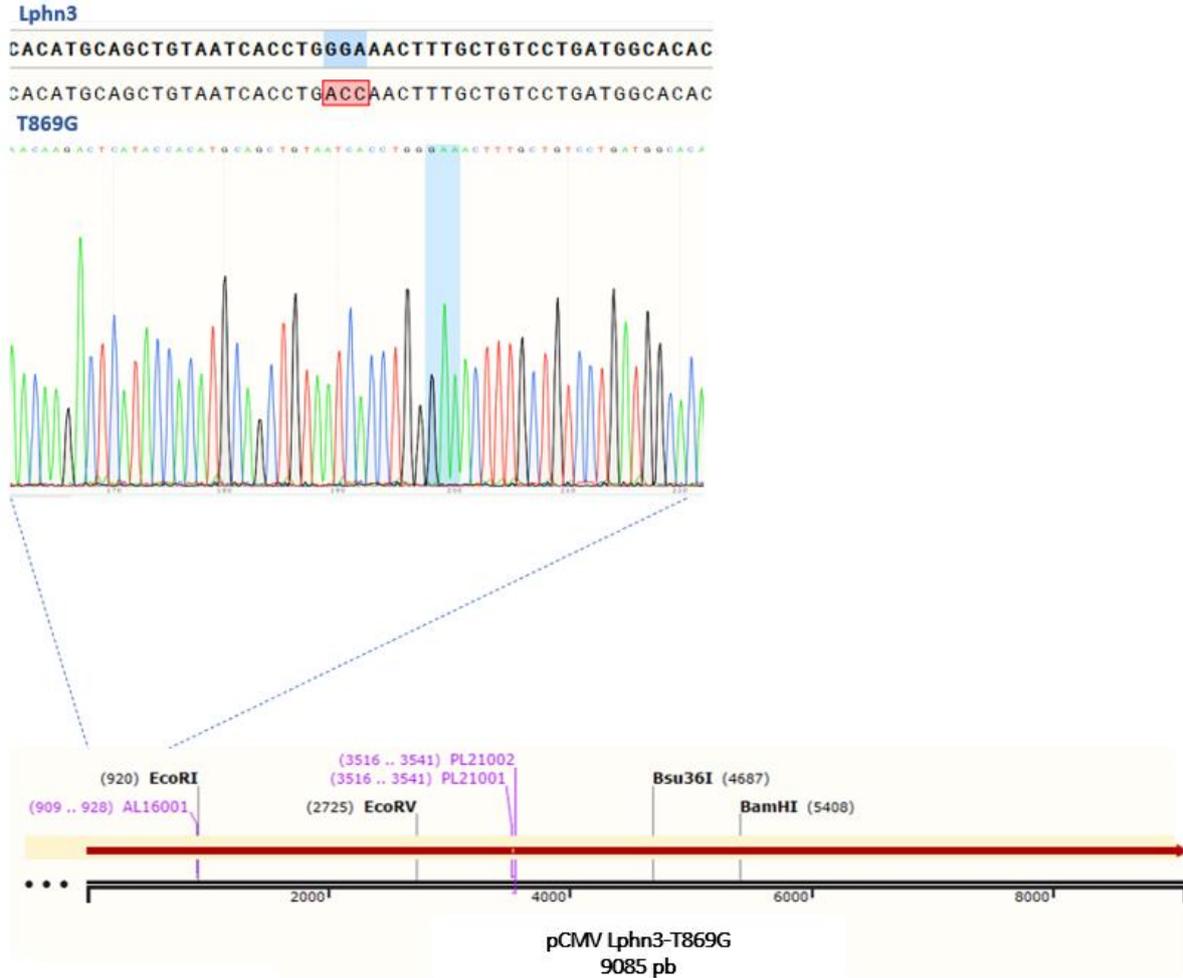


Figura 17. Resultados de secuenciación para Lphn3T869G. Alineamiento de la secuencia de la variante Lphn3T869G y Lphn3 WT, en la parte inferior en cuadro rojo se indica la inserción del nucleótido que lleva a cabo el cambio de una Treonina por una Glicina en la posición 869.

8.5 Western Blotting

Para evaluar la expresión de la variante en nuestro modelo de estudio, las células HEK293T fueron cultivadas hasta alcanzar una confluencia de 80% y posteriormente fueron transfectadas por el método de PEI (polietilenimina) con los plásmidos que contenían el ADN codificante para la Lphn3^{HA-FLAG} silvestre y Lphn3T869G^{HA-FLAG} mutante. Después de 48 horas a partir de la transfección se extrajeron las proteínas totales para realizar ensayos de Western blot con el objetivo de detectar a los diferentes fragmentos generados por la autoproteólisis de los receptores. Como se puede observar en la figura 18, lisados totales de células expresando a Lphn3^{HA-FLAG} silvestre y la mutante Lphn3T869G^{HA-FLAG} fueron analizados por inmunodetección utilizando un anticuerpos anti-FLAG el cual reconoce al epítipo Flag

ubicado en el extremo amino terminal correspondiendo al NTF, y un anticuerpo anti-HA el cual reconoce al epítipo HA ubicado en la primera asa extracelular incluida en el CTF. En tres experimentos independientes (n1, n2, n3) la detección del fragmento CTF revelo una banda migrando a un peso molecular de 60 kDa para Lphn3^{HA-FLAG} mientras que en las muestras de Lphn3T869G^{HA-FLAG} se revelo una banda de 207 kDa (Figura 18A). La detección del NTF reveló la presencia de una banda de 120 kDa para Lphn3^{HA-FLAG} y de 207 kDa para Lphn3T869G^{HA-FLAG} (Figura 18B). En una detección conjunta de NTF-CTF se observa para Lphn3^{HA-FLAG} un corrimiento de banda de 60 kDa en tonalidad verde y un corrimiento de banda de 120 kDa correspondientes a la fracción CTF y NTF respectivamente, también se observa para Lphn3T869G^{HA-FLAG} un traslape de corrimiento de bandas de 207 kDa en tonalidad amarilla relacionadas con el peso teórico del receptor no cortado, no obstante, se detectó una banda adicional para la mutante que representan fragmentos resultantes de modificaciones postraduccionales desconocidas (figura 18C). Como control negativo se encuentran las muestras de células HEK293T que no fueron transfectadas (S/T), y como se observa no ningún corrimiento de banda en estos carriles (Figura 18A),18B) 18C)).

También se muestran los gráficos correspondientes al análisis fluorométrico de tres experimentos independientes, comparando el NTF y CTF en proteínas totales de Lphn3^{HA-FLAG} y Lphn3T869G^{HA-FLAG}, se observa que la variante tiene un aumento Lphn3T869G^{HA-FLAG} en comparación con Lphn3^{HA-FLAG}, esta tendencia es estadísticamente significativa (Figura 18D) y 18E)).

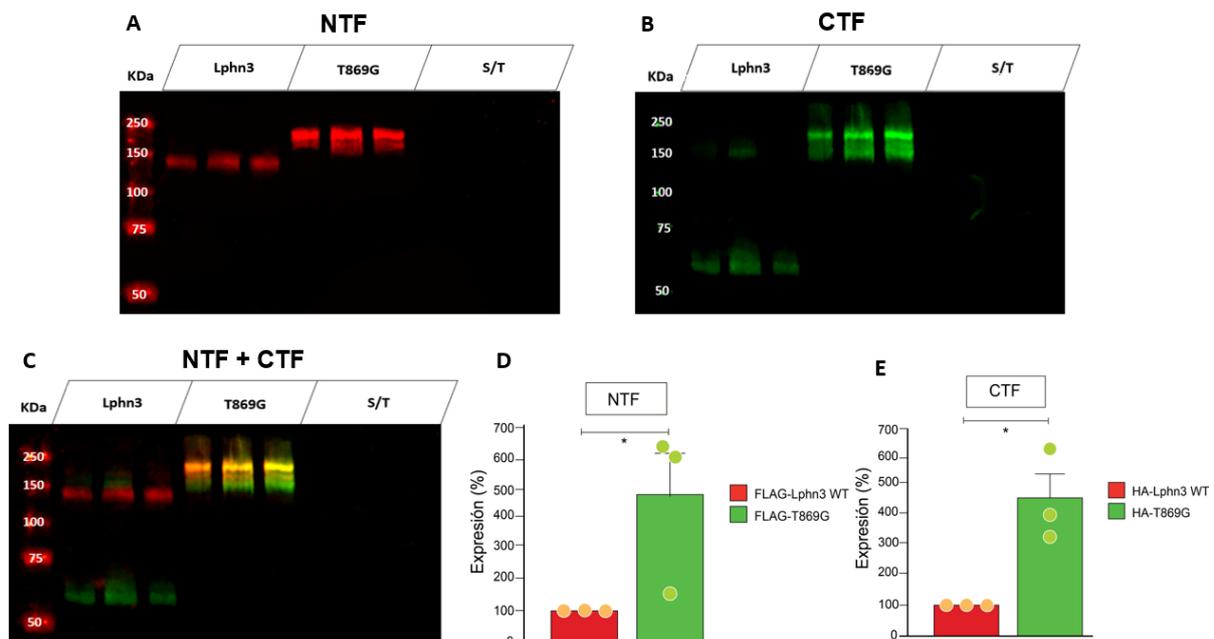


Figura 18. Expresión de Lphn3 WT y la mutante Lphn3T869G. A) Western Blot realizado para la detección del receptor Lphn3-WT y variante Lphn3-T869G usando anticuerpo anti-HA, donde se observa la presencia de un corrimiento de banda en la fracción de CTF generada después de la autoproteólisis en Lphn3 (~60 kDa), para la variante no escindible Lphn3-T869G se observa un corrimiento de banda más arriba en los carriles (207 kDa) correspondientes al receptor completo. B) Detección de la fracción NTF usando anti-FLAG muestra la presencia de un corrimiento de banda correspondiente a la fracción NTF en el receptor Lphn3-WT (~120 kDa) y la proteína variante Lphn3-T869G (~207 kDa). C) Detección conjunta de las fracciones NTF y CTF en los receptores Lphn3-WT y Lphn3-T869G, se observa la fracción CTF (~60 kDa) y NTF (~120 kDa) separadas en el receptor Lphn3-WT, mientras que en el receptor Lphn3-T869G se observa un traslape en el corrimiento de bandas exhibiendo una tonalidad amarilla. Se uso de control de carga tubulina (Tub) (~50 kDa), corrimiento de banda se muestra al final en todos los carriles. D) Análisis fluorométrico de la fracción NTF en los dos receptores Lphn3-WT y Lphn3-T869G. E) Análisis fluorométrico de la fracción CTF en los dos receptores Lphn3-WT y Lphn3-T869G. Los datos se representan como los valores medios de al menos tres experimentos independientes (n =3). Los valores entre la variante Lphn3-T869G y Lphn3-WT los datos se indican mediante * $P \leq 0,05$.

8.6 Expresión membranal del receptor Lphn3T869G

Las células HEK293 transfectadas con plásmidos que codifican la mutante T869G del receptor, Lphn3 y con vectores vacíos, se transfirieron de placas de 6 pocillos a placas de 96 pocillos tratadas con poli-L-Lisina (Sigma-Aldrich) tras 24 horas después de la transfección y se cultivaron durante un día más. Las células con PFA al 4% durante 10 minutos en hielo y se incubaron en una solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente antes de añadir el anticuerpo policlonal anti-Flag (proporción 1:5.000 en una solución de bloqueo que contenía 3% de BSA y TBST), seguido de una hora más en presencia de anticuerpo secundario anti-conejo acoplado con peroxidasa de rábano (proporción 1:2000 en solución de bloqueo. La reacción colorimétrica se indujo añadiendo el sustrato cromogénico de la peroxidasa de rábano, tetrametilbencidina (TMB; Sigma-Aldrich), que se detuvo añadiendo 1 N H₂SO₄ y dando lugar a una solución de color amarillo. La absorbencia a 450 nm se determinó utilizando el lector de microplacas Cytation5 (Biotek, Winooski, VT, EE.UU.).

El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA unidireccional. Los datos se normalizaron con respecto a Lphn3y se representaron como los valores medios obtenidos de al

menos tres experimentos independientes (n=3) de cuatro réplicas cada uno de ellos con barras de error que representan el valor estándar de las medias (E.S.M.).

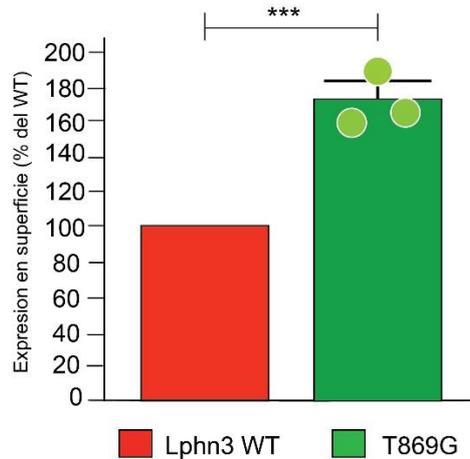


Figura 19. Expresión de membrana de Lphn3 WT y la mutante Lphn3T869G. Análisis DESC realizado para la detección de la expresión en superficie celular usando anticuerpo FLAG-HRP. Se muestra expresión superior del receptor Lphn3-T869G en comparación con el Lphn3-WT. Las barras de error indican E.S.M; indican los valores entre la variante Lphn3-T869G y Lphn3-WT los datos se indican mediante *** $P \leq 0,001$.

8.7 Perfil de acople a proteínas G de la variante Lphn3T869G

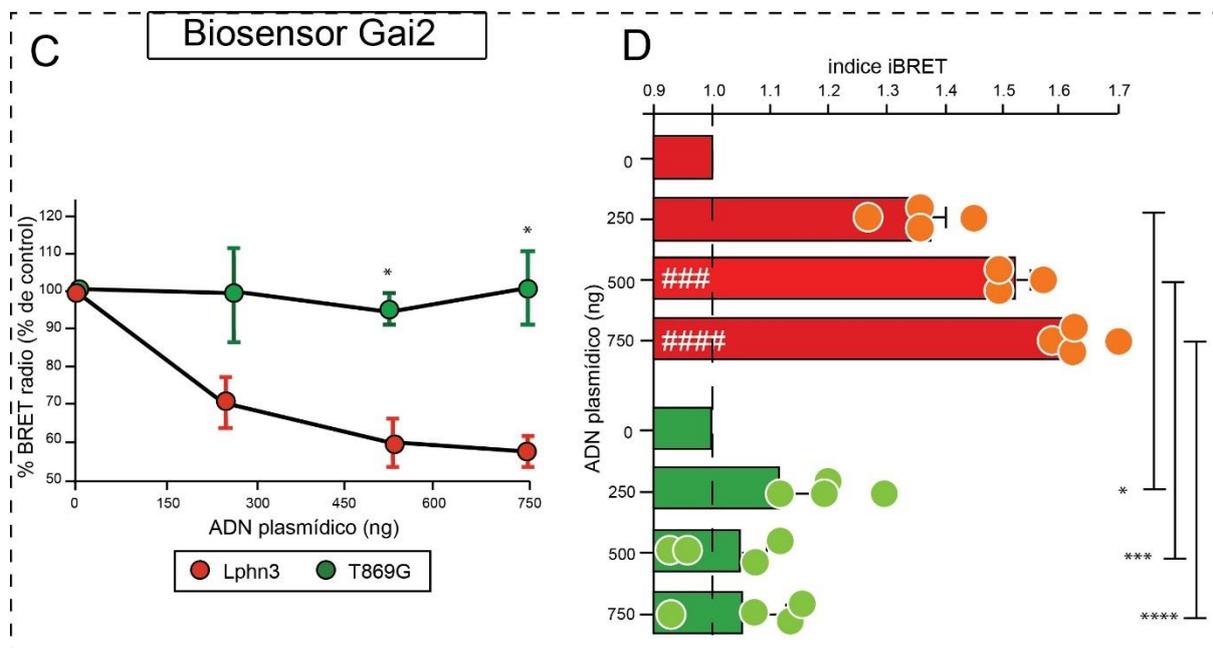
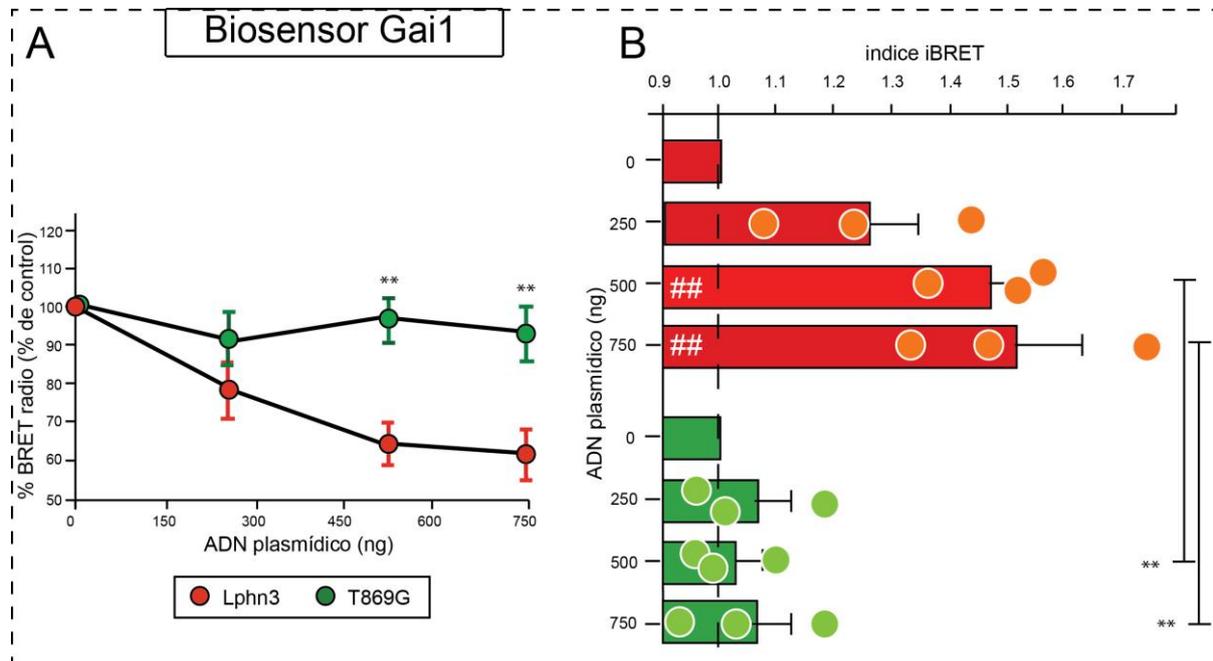
Analizamos la eficiencia de acoplamiento de Lphn3 y la mutante Lphn3T869G con familias de proteínas G seleccionadas: Gai1, Gai2, Gai3, Ga11, Ga12, Ga13, GaQ y GasS, mediante el uso de la técnica de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET). Esta técnica se puede utilizar para monitorear la activación de las cuatro familias de proteínas G heterotriméricas (Gs, G q/11, Gi y G12/13). El ensayo se basa en la disminución de la afinidad que se produce entre las subunidades G α y los dímeros G $\beta\gamma$ cuando se activan los heterotrimeros (se unen a GTP) y la liberación resultante de G $\beta\gamma$.

El radio BRET², se determinó calculando la relación entre la emisión de fluorescencia del aceptor GFP2 (515/40 nm) y la emisión de luminiscencia del donante RLuc8 (410/80 nm). Esta relación de señal se convirtió en un índice iBRET para describir los perfiles de activación de biosensores proporcionalmente con valores crecientes, lo que indica activación cuando los valores muestran una significación superior a 1.

Expresamos el receptor Lphn3 y la mutante Lphn3T869G en células HEK293 junto con biosensores BRET TRUPATH (Olsen et al., 2020) capaces de detectar cambios conformacionales después de la activación revelada por el distanciamiento espacial entre las subunidades de proteína G α fusionadas con Rluc8 y γ fusionadas con GFP2. Se obtuvieron diferentes niveles de expresión para cada variante al aumentar las concentraciones de ADN del plásmido que codifica el receptor durante los ensayos de transfección mientras se mantenían constantes los biosensores. Este enfoque experimental favoreció una expresión creciente de los receptores según niveles crecientes de ADN transfectados (Moreno-Salinas et al., *Molecular Psychiatry*, 2022), lo que nos permitió generar un aumento en la actividad constitutiva expresada por el sistema de receptores dado que la posa de receptores activos se verá aumentada debido que habrán más eventos de acoplos funcionales entre receptores y proteínas G según el modelo de activación ternario de GPCRs desarrollado por Kenakin (Kenakin, *Ann.Rev.Pharmacol. Toxicol*; 2002).

En el presente estudio mientras analizamos los miembros de la familia de biosensores Gi, encontramos que Lphn3-WT mostró una eficiencia en el acoplamiento a todos los biosensores Gi y que demostraron una cinética de activación alta cuando se acoplaron a Gi1, Gi2 y Gi3 con una señal iBRET superior a 1.2 a partir de 250 ng de ADN plásmidico, en cambio el receptor Lphn3-T869G mostró valores de radio BRET² cercanos al 100% e índice iBRET no significativo para activación constitutiva (Figuras 21A al 21F). Posteriormente, probamos la activación de un biosensor GsS (generado por omisión del exón 3 de las transcripciones de Gas, lo que da como resultado la generación de la isoforma Gas-short o -corta) que reveló que Lphn3-WT y Lphn3-T869G tienen actividad constitutiva exhibiendo un aumento sólido en la señal iBRET y una disminución fuerte en los valores de radio BRET² mostrando acople por parte de los dos receptores a este biosensor, cabe destacar que Lphn3-T869G mostró un acople menor en comparación con el receptor silvestre Lphn3 (Figura 22A y 22B). Luego nos enfocamos en analizar los biosensores de proteína G que transmiten la actividad de las proteínas G conocidas por la modulación de calcio como G11 y Gq (Figura 23). Se detectó una señal iBRET y una disminución de valores radio BRET² apreciable con los biosensores G11 y Gq al analizar la actividad constitutiva de Lphn3, lo que denota niveles de activación distinguibles del receptor Lphn3-WT, en cambio el receptor Lphn3-T869G no mostró la misma disminución de valores de radio BRET² y un índice iBRET menor a al receptor Lphn3-WT, exhibiendo una disminución en la activación constitutiva del receptor hacia estas proteínas G (Figura 23). En los biosensores de las familias G12 y 13 se probó el acoplamiento distintivo de

este par de proteínas G relacionadas funcionalmente (Figura 24). Lphn3-WT mostró una activación constitutiva detectable de los biosensores G12 y G13, exhibiendo disminución en los valores radio BRET² e índice iBRET por arriba del valor de 1, en cambio el receptor Lphn3-T869G manifestó un comportamiento significativamente diferente al receptor nativo Lphn3-WT, manteniendo una tendencia cerca al 100% de radio BRET² (niveles basales) y con índice iBRET menores a 1.2 para G12 y menores a 1 en G13 (Figura 24B y 24D).



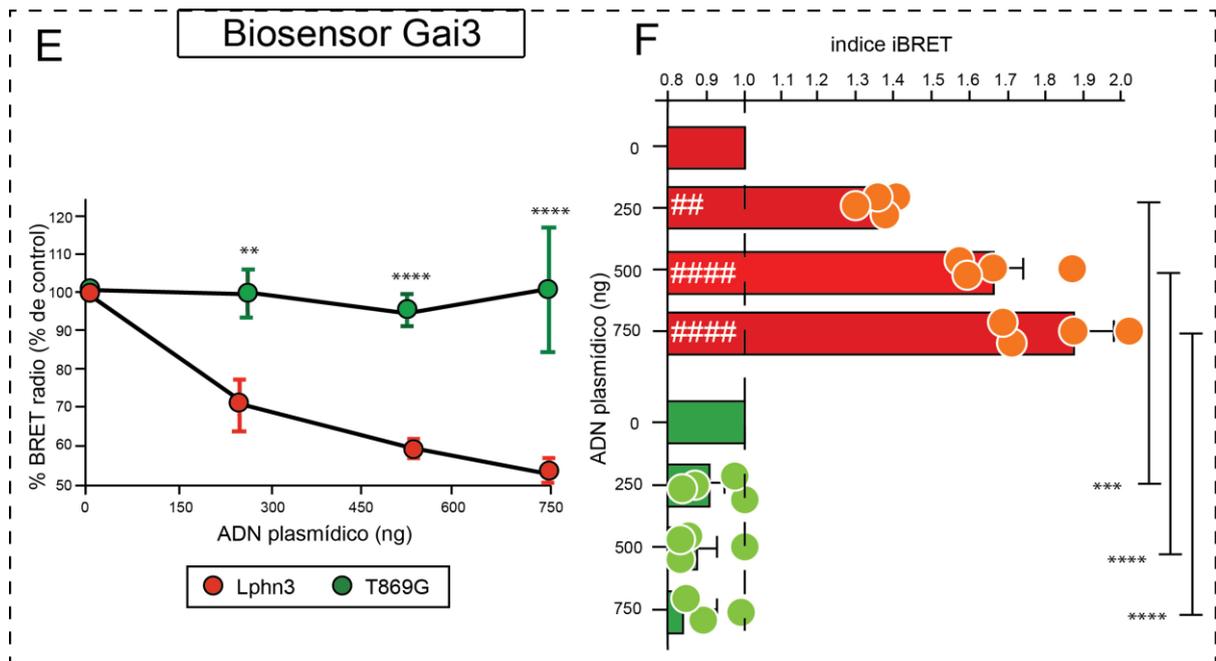


Figura 20. Perfil de acoplamiento comparativo de la variante Lphn3T869G a los biosensores Gi1-Gi2-Gi3, relacionados a la inhibición de niveles de AMPc. A) Radio BRET² para el biosensor Gi1 expresado en términos de porcentaje del radio BRET² obtenido con la condición control (0ng de receptor) mostrando una disminución de los valores para el receptor Lphn3-WT (en rojo) correspondiendo a una cinética de activación mientras se detecta una falta de activación del biosensor con la variante Lphn3-T869G (en rojo). B) Índice iBRET para Gi1, indica la activación cuando los valores muestran una significación superior a 1, proporcionalmente con valores crecientes del receptor Lphn3-WT (rojo), para el receptor mutante Lphn3-T869G (en verde) los valores no son significativos para el valor de 1, lo que indica falta de activación para este receptor. C) Radio BRET² para el biosensor Gi2 expresado en porcentaje del radio BRET² mostró una disminución de los valores del receptor Lphn3 WT (rojo), mientras que la variante Lphn3-T869G (verde) no muestra activación. D) Resultados de índice iBRET con valores superiores a 1 indicando activación para Lphn3 silvestre, la variante Lphn3-T869G (verde) no mostro significancia en activación para índice iBRET. E) Radio BRET² para Gi3 muestra una disminución de los valores para Lphn3, la variante Lphn3-T869G no mostró disminución característica de activación. F) Activación del biosensor Gi3 que reveló que Lphn3-WT (rojo) inducía constitutivamente un aumento sólido en la señal iBRET y que esta actividad no se vio afectada por la presencia de la mutación Lphn3T869G (verde). Los datos se representan como los valores medios de al menos tres experimentos independientes de tres repeticiones cada uno (n =3) para Gi1 y cuatro experimentos independientes de tres repeticiones cada uno (n=4) para Gi2 y Gi3. Valores de *P* que describen la importancia entre

las variante Lphn3T869G del receptor y el Lphn3-WT: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$; Valores de P que describen la importancia entre 0 ng de ADN (línea de puntos) y una concentración de ADN determinada dentro del grupo de variantes del receptor indicado: ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$, #### $P < 0,0001$.

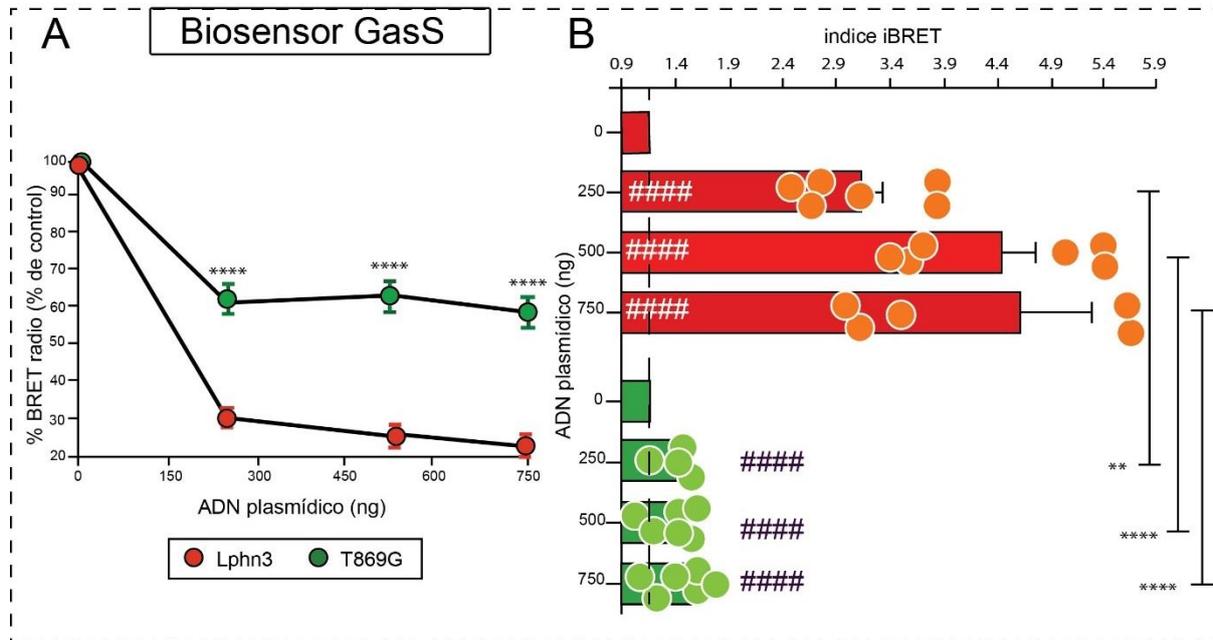


Figura 21. Perfil de acoplamiento comparativo de la variante Lphn3T869G a los biosensores GsS, relacionados a la activación de niveles de AMPc. A) Gráficos de radio BRET² determinados en células que expresan cantidades crecientes de receptor para el biosensor GsS, expresado en términos de porcentaje del radio BRET² obtenido con la condición control (0ng de receptor) mostrando una disminución de los valores para el receptor Lphn3-WT (en rojo) correspondiendo a una cinética de activación mientras la mutante Lphn3T869G (en verde) también mostró una disminución de los valores, pero menor de las proteínas GsS. B) Índice iBRET para GsS, indica la activación cuando los valores muestran una significación superior a 1, proporcionalmente con valores crecientes del receptor Lphn3-WT (en rojo), para el receptor mutante Lphn3T869G (en verde) los valores no son significativos para el valor de 1, lo que indica falta de activación para este receptor. Los datos se representan como los valores medios de al menos seis experimentos independientes de tres repeticiones cada uno (n =3) para GsS. Valores de P que describen la importancia entre las variante Lphn3T869G del receptor y el Lphn3-WT: ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$; Valores de P que describen la importancia entre 0 ng de ADN (línea de puntos) y una concentración de ADN determinada dentro del grupo de variantes del receptor indicado: ##### $P < 0,0001$.

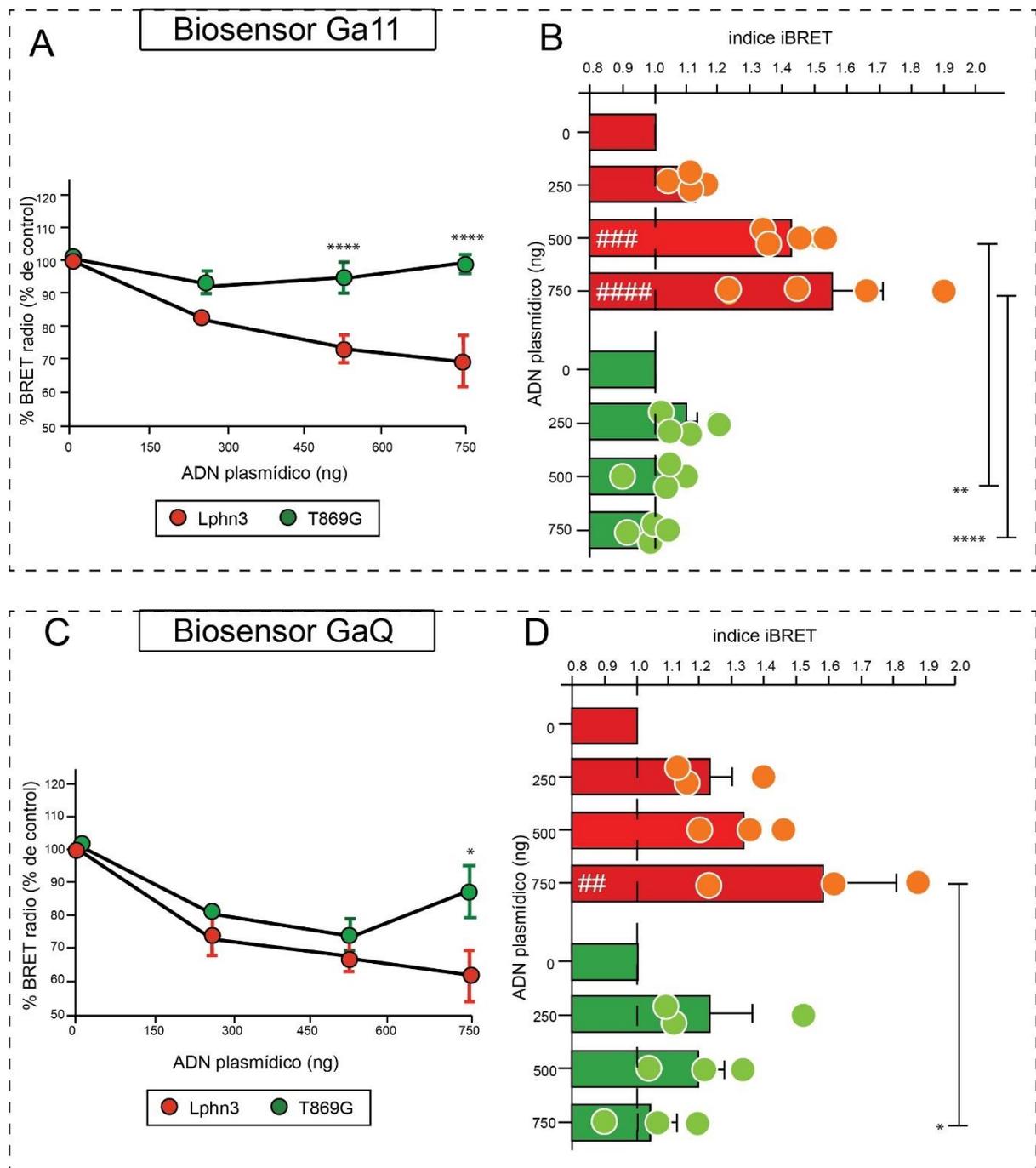
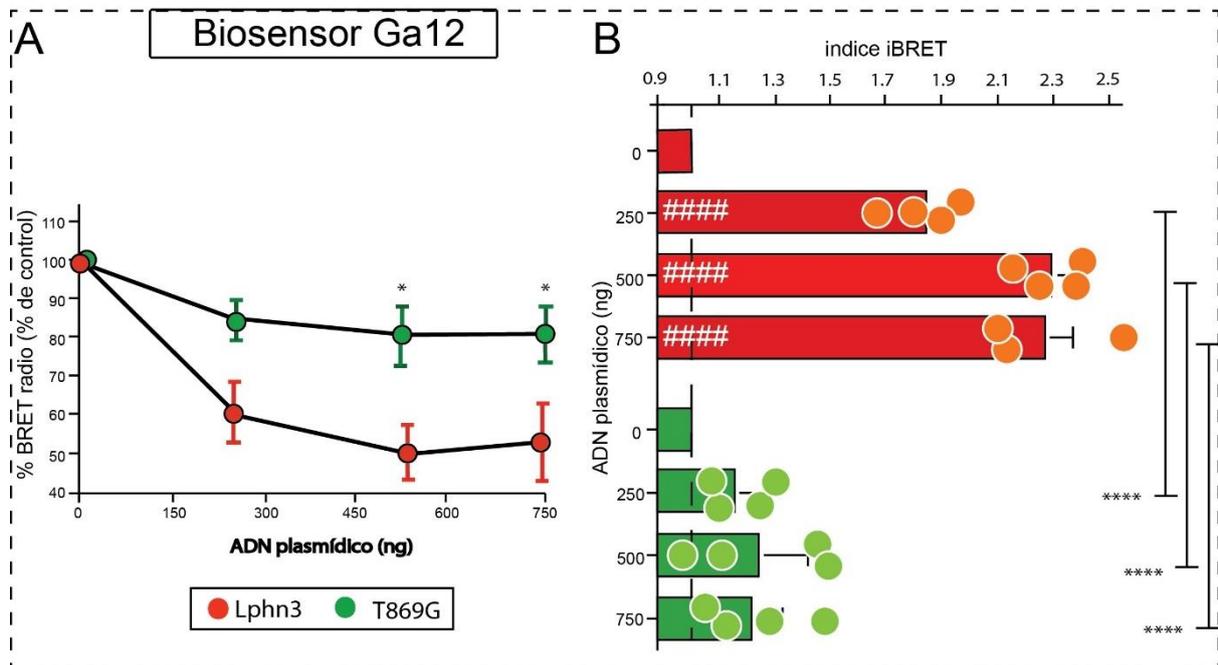


Figura 22. Perfil de acoplamiento comparativo de la variante Lphn3T869G a los biosensores G11-GQ, relacionados a la modulación de calcio. A) Radio BRET² para el biosensor G11 expresado en términos de porcentaje del radio BRET² obtenido con la condición control (0ng de receptor) mostrando una disminución de los valores para el receptor Lphn3-WT (en rojo) correspondiendo a una cinética de activación mientras no se detecta una disminución de activación del biosensor con la variante Lphn3T869G (en verde). B) Índice iBRET para G11, indica la activación cuando los valores muestran una significación superior a 1, proporcionalmente con valores crecientes del receptor Lphn3-WT, para el receptor mutante

Lphn3T869G los valores no son significativos para el valor de 1, lo que indica falta de activación para este receptor. C) Radio BRET² para el biosensor GQ expresado en porcentaje del radio BRET² mostró una disminución de los valores del receptor Lphn3-WT (en rojo), mientras que la variante Lphn3T869G (en verde) muestra una disminución activación. D) Resultados de índice iBRET con valores superiores a 1 indicando activación para Lphn3 silvestre, mientras la variante Lphn3T869G no mostro significancia en activación para índice iBRET. Los datos se representan como los valores medios de al menos tres experimentos independientes de tres repeticiones cada uno (n =3) para G11 y cuatro experimentos independientes de tres repeticiones cada uno (n=4) para GQ. Valores de p que describen la importancia entre las variante Lphn3T869G del receptor y el Lphn3-WT: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$; Valores de P que describen la importancia entre 0 ng de ADN (línea de puntos) y una concentración de ADN determinada dentro del grupo de variantes del receptor indicado: ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$, #### $P < 0,0001$.



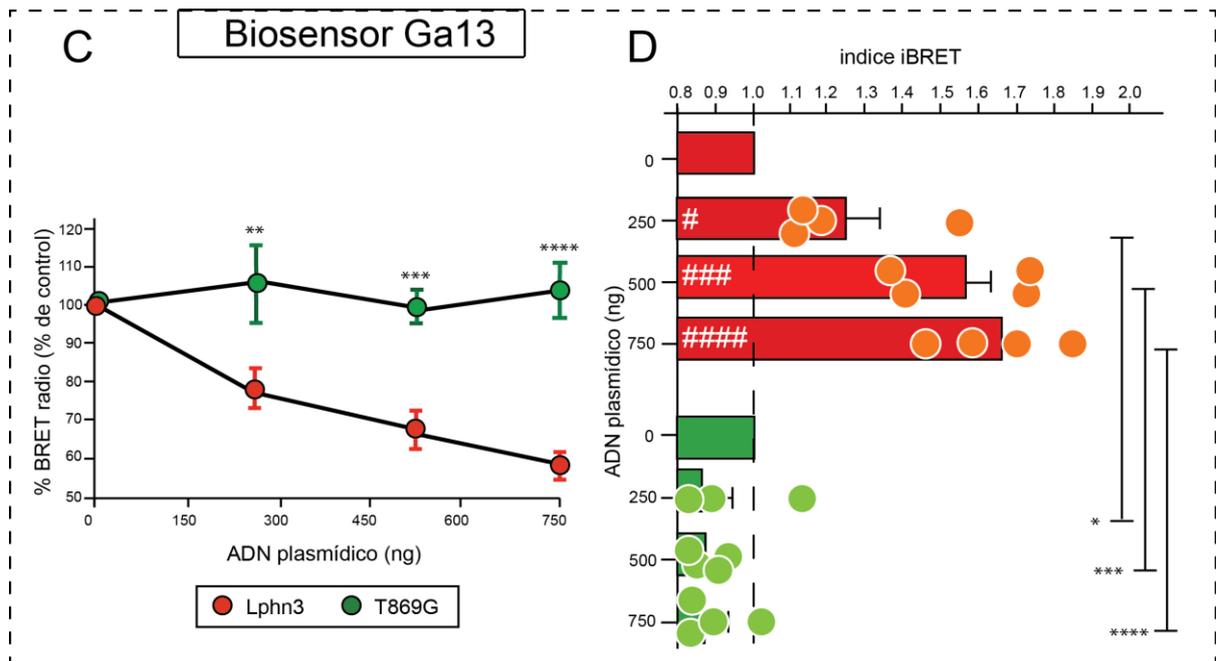


Figura 23. Figura 21. Perfil de acoplamiento comparativo de la variante Lphn3T869G a los biosensores G12-G13, relacionados a la modulación de Rho A) Radio BRET² para el biosensor G12 expresado en términos de porcentaje del radio BRET² obtenido con la condición control (0ng de receptor) mostrando una disminución de los valores para el receptor Lphn3-WT (en rojo) correspondiendo a una cinética de activación mientras se detecta una falta de activación del biosensor con la variante Lphn3T869G (en rojo). B) Índice iBRET para G12, indica la activación cuando los valores muestran una significación superior a 1, proporcionalmente con valores crecientes del receptor Lphn3-WT (rojo), pero los valores no son significativos para el receptor mutante Lphn3T869G (en verde) lo que indica falta de activación para este receptor. C) Radio BRET² para el biosensor G13 expresado en porcentaje del radio BRET² mostró una disminución de los valores del receptor Lphn3-WT (rojo), mientras que la variante Lphn3T869G (verde) no muestra activación. D) Resultados de índice iBRET con valores superiores a 1 indicando activación para Lphn3-WT, la variante Lphn3T869G (verde) no mostró significancia en activación para índice iBRET. e) Radio BRET² para G13 muestra una disminución de los valores para Lphn3, la variante Lphn3T869G no mostró disminución característica de activación. Los datos se representan como los valores medios de al menos cuatro experimentos independientes de tres repeticiones cada uno (n=4) para G12 y G13. Valores de p que describen la importancia entre las variante Lphn3T869G del receptor y el Lphn3-WT: * P < 0,05, ***P < 0,001, **** P < 0,0001; Valores de P que describen la importancia entre 0 ng de ADN (línea de puntos) y una concentración de ADN

determinada dentro del grupo de variantes del receptor indicado: # $P < 0,05$, ### $P < 0,001$,
$P < 0,0001$.

9 Discusión

Las Lphns pertenecen al grupo de los aGPCRs. Actualmente se ha reportado que los receptores latrofilinas tienen funciones fisiológicas como en la formación de sinapsis y adhesión intercelular. Este receptor posee tres isoformas siendo la isoforma 3 tiene la mayor asociación con patologías humanas hasta la fecha, sin embargo, muy poco se conoce de la importancia del corte autoproteolítico en su acople a proteína G (Boucard et al., 2014; Meza-Aguilar and Boucard, 2014; Moreno-Salinas et al., 2022). Por lo tanto, con este trabajo pretendemos indagar en la activación de proteínas G presente en el grupo de los aGPCRs.

Para evaluar lo antes mencionado en este estudio se generó la construcción del receptor Lphn3 con una mutación en la posición 869 de una treonina cambiándola por una glicina. Cabe destacar que este cambio se encuentra en su dominio extracelular GAIN, en el sitio GPS involucrado en el proceso de corte autoproteolítico. Para esto se empleó la técnica de PCR por extensión sobrepuesta, y una vez que presuntamente se obtuvo la construcción, el ADN plasmídico se sometió a una reacción de digestión empleando las enzimas: EcoRV y BamHI para verificar si el fragmento completo se insertó en la orientación correcta. De acuerdo con los resultados de secuenciación obtenidos, la variante T869G de Lphn3 fue generada de manera exitosa. Cabe destacar que tanto Lphn3 como su variante Lphn3-T869G se encuentran acopladas a HA y FLAG en CTF y NTF respectivamente, lo que facilitó la detección de ambas en los siguientes ensayos.

Existen reportes en aGPCR de mutaciones en la secuencia de consenso de escisión en HL↓(S/T) en las posiciones GPS H528A (-2) y GPS T530A (+1), que eliminan la actividad de escisión autocatalítica, pero retienen la expresión en la superficie celular de LAT-1 y su parálogo LAT-2 de tipo latrofilina (Prömel et al., 2012a). Además se ha reportado que la policistina-1 (PC1) recombinante muestra que se escinde dentro del motivo GPS en el sitio 3041 HL↓T, los resultados mostraron que una proporción significativa de la PC1 recombinante sobreexpresada permanece sin escindir en varias células de mamífero (Kurbegovic et al., 2014).

Al evaluar la expresión total mediante Western blot se detectó la forma no cortada para Lphn3-WT y su variante no escindible Lphn3-T869G exhibió su expresión significativamente mayor, mostrando un corrimiento de bandas de un peso aparente a los ~207 kDa para el receptor no cortado. Además, la fracción CTF y NTF de Lphn3-WT también fue detectada la presencia de dos corrimientos de bandas detectadas en un rango de 60 y 120 kDa respectivamente. Tanto CTF y NTF tenían bandas adicionales que corresponde al peso esperado del CTF cuando el receptor sufre de modificaciones postraduccionales desconocidas (Avila-Zozaya et al., 2022).

Los resultados de sobre expresión de la mutante Lphn3-T869G son similares los reportados por Sando y colaboradores (2019), en la caracterización de la misma mutante Lphn3-T869G (Sando et al., 2019).

Para conocer la presencia de Lphn3-T869G en la membrana celular, nosotros evaluamos la expresión de NTF en la superficie celular por medio de ensayos de DESC, en el caso de Lphn3-T869G, se observó un aumento significativo de la expresión en la membrana celular en comparación con la Lphn3 silvestre. Se ha reportado previamente que mutantes no escindibles (con cambio de aminoácido en el sitio GPS) de los inhibidores de la angiogénesis cerebral (BAI3) y de Lphn1 se transportan eficientemente a la membrana plasmática en las células HEK293, lo que indica que la escisión en el GPS no es necesaria para el transporte superficial de un GPCR de adhesión celular (Araç et al., 2012). Otros estudios han demostrado que la mutante Lphn3-T869G se transporta a la superficie celular y se pliega correctamente (Sando et al., 2019).

Nuestros datos describen una activación constitutiva de Lphn3 con el uso de biosensores BRET de Trupath (Olsen et al., 2020), mostrando acople para $G\alpha_{11}$ y $G\alpha_{12}$, y la familia de isoformas $G\alpha_{i1}$ ($G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$ y $G\alpha_{i3}$), además de acople para $G\alpha_{13}$ pero también $G\alpha_q$, destacando una fuerte activación para $G\alpha_s$. En este estudio hay una señal de radio BRET² baja para Lphn3-WT para todos los biosensores probados, indicando la conformación activa de las proteínas G evaluadas. También este receptor, Lphn3-WT, se evidencia una cinética de activación constitutiva mostrando acoplé a todos los biosensores probados con una señal iBRET superior al valor de 1, destacando que $G\alpha_s$ mostró una activación más alta comparada al resto de biosensores probados, incluso para la variante Lphn3-T869G, además se detectó en esta variante una señal iBRET superior a 1, indicando activación significativa para la actividad constitutiva. Una observación importante de destacar es que la variante Lphn3-T869G tiene activación para $G\alpha_s$, pero menor al receptor nativo.

La propiedad de Lphn3-WT de acoplarse a diversas proteínas G como son: $G\alpha_{13}$, $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_s$ y $G\alpha_q$, ya ha sido descrita previamente (Moreno-Salinas et al., 2022). Además, Mathiasen y colaboradores (2020) reportó el acople a proteínas G de una versión truncada del receptor Lphn3 careciendo de su NTF, detectando la activación de las proteínas $G\alpha_{13}$, $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_q$ y $G\alpha_{12}$ pero no a $G\alpha_s$ lo que sugiere la importancia de la región NTF en el perfil de acople a proteínas G. Mientras Moreno-Salinas y colaboradores (2022) no detectó la activación a $G\alpha_{12}$, aunque se hizo la comprobación con el receptor completo, lo que podría atribuirse al uso de

sondas diferentes en el presente estudio, las cuales podrían ser más sensibles a cambios conformacionales entre las subunidades α y γ de la proteína G12.

Anteriormente se han construido mutantes T4L (inserción de lisozima T4) para Lphn2 y Lphn3, que anulan el acoplamiento de proteína G y altera la señalización de arrestina a estos GPCR, comparando estas mutantes con sus respectivos receptores nativos en células HEK293 se demostró que Lphn2 y Lphn3 tienen una actividad de GPCR constitutivamente activa que eleva los niveles de cAMP, y que esta actividad está bloqueada por la mutación T4L eliminando la señalización de GPCR (Sando and Südhof, 2021). Además las mutantes T4L de Lphn2 y Lphn3 no afectan el transporte superficial de Lphn2 y Lphn3 y también no se afecta su tráfico a las espinas dendríticas, en este mismo estudio un análisis de la actividad in vivo de Lphn2-WT y Lphn3-WT y las mutantes de Lphn2 y Lphn3 utilizaron neuronas del hipocampo en ratones knockout condicionales con pérdida de conectividad sináptica, demostrando que Lphn2 y Lphn3 restauraron la conectividad sináptica, además de mantener la sinapsis excitatoria y la adhesión a los ligandos endógenos de teneurina y FLRT. El análisis de Lphn2 y Lphn3 WT y Lphn2 y Lphn3 mutantes en células HEK293 demostraron que Lphn2 y Lphn3 exhiben una actividad de GPCR constitutivamente activa que eleva los niveles de cAMP, y que esta actividad está bloqueada por la mutación T4L, que se sabe que elimina la señalización de GPCR. (Sando et al., 2019; Sando and Südhof, 2021).

Es importante destacar que la mutante Lphn3-T869G pierde su acople a varias proteínas, pero la proteína GsS si es capaz de activarla, a un nivel más reducido pero comparable con el receptor WT. De acuerdo con los resultados de Sando y colaboradores (2021) donde co-transfectaron pink flamido un indicador de cAMP fluorescente en células HEK293 con Lphn3, Gas, G β 1 y G γ 2, y a partir de esto demostraron que Lphn3 es un GPCR constitutivamente activo que mejora los niveles de cAMP cuando se expresa en células HEK293 y mostraron que Lphn3 es esencial para promover la formación de sinapsis. En conjunto con los resultados de Sando y colaboradores (2019) en el que usaron células de hipocampo en el que Cre-recombinasa abolió la expresión de Lphn3, a partir se demostró que Lphn3-T869G fue capaz de rescatar de manera eficiente la pérdida de la densidad de sinapsis, con valores similares al receptor Lphn3-WT y al Δ Cre inactivo (control), además en los valores de frecuencia de las corrientes postsinápticas excitatorias en miniatura (mEPSC), la mutante Lphn3-T869G permitió el rescate de la capacidad postsináptica (Sando et al., 2019; Sando and Südhof, 2021). Por eso nosotros sugerimos que una señalización reducida de GasS hacia cAMP puede ser

suficiente para que se forme la sinapsis y que la falta del acople a otras proteínas G no es necesario para la formación de sinapsis.

En el aGPCR LAT-1, se ha demostrado que la escisión en el motivo GPS no es necesaria para la actividad de LAT-1 en el desarrollo y la fertilidad (Prömel et al., 2012b). Otro receptor de la familia aGPCR mostró que la escisión de GPS no es necesaria para las uniones de células CD97-HeLa (Yang et al., 2017).

Aunque estudios anteriores han demostrado que la escisión del GPS no es esencial para algunas de las funciones de los aGPCR, el caso del corte autoproteolítico de Lphn3 sigue siendo una cuestión abierta, pero un primer paso crucial para construir una comprensión de su implicación en diversas funciones es comprender las vías de señalización asociadas de la proteína G. Aquí nuestro estudio proporciona una mayor comprensión del corte autoproteolítico en Lphn3 y su acople a proteína G, lo que puede apoyar a que en futuros estudios se diseccionen las interacciones con sus proteínas G, arrestinas y otras proteínas reguladoras de la función de GPCR, así también la activación de vías de señalización y su papel en diversos procesos fisiológicos y patológicos.

En resumen, nuestro estudio proporciona evidencia de una disfunción de la activación de las proteínas G analizadas por parte de la mutante Lphn3-T869G, lo que respalda que posiblemente el corte autoproteolítico es esencial para la activación de diversas proteínas G. No obstante, se necesita más evidencia, para entender el papel que desempeña en diferentes vías de señalización asociadas a proteínas G.

10 Conclusión

- La mutación Lphn3T869G evita el corte autoproteolítico de Lphn3.
- Existe mayor expresión de la mutante Lphn3T869G con respecto a la Lphn3 WT en proteínas totales y membrana.
- El receptor Lphn3 se acopla constitutivamente a: G α i1, G α i2, G α i3, G α 11, G α 12, G α Q, G α sS.
- El receptor mutante Lphn3T869G parece afectar el acople a proteínas G: G α i1, G α i2, G α i3, G α 11, G α 12, G α 13, G α Q, G α sS.

11 Perspectivas

- Analizar si el proceso de autoproteólisis es esencial para las propiedades de: adhesión intercelular, remodelación del citoesqueleto y motilidad celular.
- Evaluar los efectos del corte proteolítico de Lphn3 con ligandos endógenos.
- Evaluar la vía de Rho GTPasas con la mutante Lphn3T869G.

12 Referencias

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. *Biología molecular de la célula*, 4a ed. Garland Science.

Araç, D., Boucard, A.A., Bolliger, M.F., Nguyen, J., Soltis, S.M., Südhof, T.C., Brunger, A.T., 2012. A novel evolutionarily conserved domain of cell-adhesion GPCRs mediates autoproteolysis. *EMBO J.* 31, 1364–1378. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.26>

Arcos-Burgos, M., Jain, M., Acosta, M.T., Shively, S., Stanescu, H., Wallis, D., Domené, S., Vélez, J.I., Karkera, J.D., Balog, J., Berg, K., Kleta, R., Gahl, W.A., Roessler, E., Long, R., Lie, J., Pineda, D., Londoño, A.C., Palacio, J.D., Arbelaez, A., Lopera, F., Elia, J., Hakonarson, H., Johansson, S., Knappskog, P.M., Haavik, J., Ribases, M., Cormand, B., Bayes, M., Casas, M., Ramos-Quiroga, J.A., Hervas, A., Maher, B.S., Faraone, S.V., Seitz, C., Freitag, C.M., Palmason, H., Meyer, J., Romanos, M., Walitza, S., Hemminger, U., Warnke, A., Romanos, J., Renner, T., Jacob, C., Lesch, K.-P., Swanson, J., Vortmeyer, A., Bailey-Wilson, J.E., Castellanos, F.X., Muenke, M., 2010. A common variant of the latrophilin 3 gene, LPHN3, confers susceptibility to ADHD and predicts effectiveness of stimulant medication. *Mol. Psychiatry* 15, 1053–1066. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.6>

Avila-Zozaya, M., Rodríguez-Hernández, B., Monterrubio-Ledezma, F., Cisneros, B., Boucard, A.A., 2022. Thwarting of Lphn3 Functions in Cell Motility and Signaling by Cancer-Related GAIN Domain Somatic Mutations. *Cells* 11, 1913. <https://doi.org/10.3390/cells11121913>

Boucard, A.A., Ko, J., Südhof, T.C., 2012. High Affinity Neurexin Binding to Cell Adhesion G-protein-coupled Receptor C1RL1/Latrophilin-1 Produces an Intercellular Adhesion Complex *. *J. Biol. Chem.* 287, 9399–9413. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.318659>

Boucard, A.A., Maxeiner, S., Südhof, T.C., 2014. Latrophilins Function as Heterophilic Cell-adhesion Molecules by Binding to Teneurins: REGULATION BY ALTERNATIVE SPLICING*. *J. Biol. Chem.* 289, 387–402. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.504779>

Domené, S., Stanescu, H., Wallis, D., Tinloy, B., Pineda, D.E., Kleta, R., Arcos-Burgos, M., Roessler, E., Muenke, M., 2011. Screening of human LPHN3 for variants with a potential impact on ADHD susceptibility. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet. Off. Publ. Int. Soc. Psychiatr. Genet.* 156B, 11–18. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.31141>

Haitina, T., Olsson, F., Stephansson, O., Alsjö, J., Roman, E., Ebendal, T., Schiöth, H.B., Fredriksson, R., 2008. Expression profile of the entire family of AdhesionG protein-coupled receptors in mouse and rat. *BMC Neurosci.* 9, 43. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-9-43>

Kan, Z., Jaiswal, B.S., Stinson, J., Janakiraman, V., Bhatt, D., Stern, H.M., Yue, P., Haverty, P.M., Bourgon, R., Zheng, J., Moorhead, M., Chaudhuri, S., Tomsho, L.P., Peters, B.A., Pujara, K., Cordes, S., Davis, D.P., Carlton, V.E.H., Yuan, W., Li, L., Wang, W., Eigenbrot, C., Kaminker, J.S., Eberhard, D.A., Waring, P., Schuster, S.C., Modrusan, Z., Zhang, Z., Stokoe, D., de Sauvage, F.J., Faham, M., Seshagiri, S., 2010. Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature* 466, 869–873. <https://doi.org/10.1038/nature09208>

Kobilka, B.K., 2007. G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, G Protein-Coupled Receptors, Signaling Mechanisms and Pathophysiological Relevance 1768, 794–807. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.10.021>

- Kurbegovic, A., Kim, H., Xu, H., Yu, S., Cruanès, J., Maser, R.L., Boletta, A., Trudel, M., Qian, F., 2014. Novel Functional Complexity of Polycystin-1 by GPS Cleavage In Vivo: Role in Polycystic Kidney Disease. *Mol. Cell. Biol.* 34, 3341–3353. <https://doi.org/10.1128/MCB.00687-14>
- Langenhan, T., Piao, X., Monk, K.R., 2016. Adhesion G protein-coupled receptors in nervous system development and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 550–561. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.86>
- Langenhan, T., Schöneberg, T. (Eds.), 2016. Receptores acoplados a proteínas de adhesión G, Texto original: Principios moleculares, fisiológicos y farmacológicos en salud y enfermedad, Manual de farmacología experimental. Springer International Publishing.
- Mathiasen, S., Palmisano, T., Perry, N.A., Stoveken, H.M., Vizurraga, A., McEwen, D.P., Okashah, N., Langenhan, T., Inoue, A., Lambert, N.A., Tall, G.G., Javitch, J.A., 2020. Publisher Correction: G12/13 is activated by acute tethered agonist exposure in the adhesion GPCR ADGRL3. *Nat. Chem. Biol.* 16, 1440–1440. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0649-z>
- Meza-Aguilar, D.G., Boucard, A.A., 2014. Latrophilins updated. *Biomol. Concepts* 5, 457–478. <https://doi.org/10.1515/bmc-2014-0032>
- Monk, K.R., Naylor, S.G., Glenn, T.D., Mercurio, S., Perlin, J.R., Dominguez, C., Moens, C.B., Talbot, W.S., 2009. A G Protein-Coupled Receptor is Essential for Schwann Cells to Initiate Myelination. *Science* 325, 1402–1405. <https://doi.org/10.1126/science.1173474>
- Moreno-Salinas, A.L., Avila-Zozaya, M., Ugalde-Silva, P., Hernández-Guzmán, D.A., Missirlis, F., Boucard, A.A., 2019. Latrophilins: A Neuro-Centric View of an Evolutionary Conserved Adhesion G Protein-Coupled Receptor Subfamily. *Front. Neurosci.* 13, 700. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00700>
- Moreno-Salinas, A.L., Holleran, B.J., Ojeda-Muñoz, E.Y., Correoso-Braña, K.G., Ribalta-Mena, S., Ovando-Zambrano, J.-C., Leduc, R., Boucard, A.A., 2022. Convergent selective signaling impairment exposes the pathogenicity of latrophilin-3 missense variants linked to inheritable ADHD susceptibility. *Mol. Psychiatry* 27, 2425–2438. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01537-3>
- Morin, R.D., Mendez-Lago, M., Mungall, A.J., Goya, R., Mungall, K.L., Corbett, R.D., Johnson, N.A., Severson, T.M., Chiu, R., Field, M., Jackman, S., Krzywinski, M., Scott, D.W., Trinh, D.L., Tamura-Wells, J., Li, S., Firme, M.R., Rogic, S., Griffith, M., Chan, S., Yakovenko, O., Meyer, I.M., Zhao, E.Y., Smailus, D., Moksa, M., Chittaranjan, S., Rimsza, L., Brooks-Wilson, A., Spinelli, J.J., Ben-Neriah, S., Meissner, B., Woolcock, B., Boyle, M., McDonald, H., Tam, A., Zhao, Y., Delaney, A., Zeng, T., Tse, K., Butterfield, Y., Birol, I., Holt, R., Schein, J., Horsman, D.E., Moore, R., Jones, S.J.M., Connors, J.M., Hirst, M., Gascoyne, R.D., Marra, M.A., 2011. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* 476, 298–303. <https://doi.org/10.1038/nature10351>
- Nazarko, O., Kibrom, A., Winkler, J., Leon, K., Stoveken, H., Salzman, G., Merdas, K., Lu, Y., Narkhede, P., Tall, G., Prömel, S., Araç, D., 2018. A Comprehensive Mutagenesis Screen of the Adhesion GPCR Latrophilin-1/ADGRL1. *iScience* 3, 264–278. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.04.019>
- Olsen, R.H.J., DiBerto, J.F., English, J.G., Glaudin, A.M., Krumm, B.E., Slocum, S.T., Che, T., Gavin, A.C., McCorvy, J.D., Roth, B.L., Strachan, R.T., 2020. TRUPATH, an open-source

biosensor platform for interrogating the GPCR transducerome. *Nat. Chem. Biol.* 16, 841–849. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0535-8>

O'Sullivan, M.L., de Wit, J., Savas, J.N., Comoletti, D., Otto-Hitt, S., Yates, J.R., Ghosh, A., 2012. FLRT Proteins Are Endogenous Latrophilin Ligands and Regulate Excitatory Synapse Development. *Neuron* 73, 903–910. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.01.018>

Piao, X., Hill, R.S., Bodell, A., Chang, B.S., Basel-Vanagaite, L., Straussberg, R., Dobyns, W.B., Qasraui, B., Invierno, R.M., Innes, A.M., Voit, T., Ross, M.E., Michaud, J.L., Descarrie, J.-C., Barkovich, A.J., Walsh, C.A., 2004. G Protein-Coupled Receptor-Dependent Development of Human Frontal Cortex. *Science* 303, 2033–2036. <https://doi.org/10.1126/science.1092780>

Prömel, S., Frickenhaus, M., Hughes, S., Mestek, L., Staunton, D., Woollard, A., Vakonakis, I., Schöneberg, T., Schnabel, R., Russ, A.P., Langenhan, T., 2012a. The GPS Motif Is a Molecular Switch for Bimodal Activities of Adhesion Class G Protein-Coupled Receptors. *Cell Rep.* 2, 321–331. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.06.015>

Prömel, S., Waller-Evans, H., Dixon, J., Zahn, D., Colledge, W.H., Doran, J., Carlton, M.B.L., Grosse, J., Schöneberg, T., Russ, A.P., Langenhan, T., 2012b. Characterization and functional study of a cluster of four highly conserved orphan adhesion-GPCR in mouse. *Dev. Dyn.* 241, 1591–1602. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23841>

Qian, F., Boletta, A., Bhunia, A.K., Xu, H., Liu, L., Ahrabi, A.K., Watnick, T.J., Zhou, F., Germino, G.G., 2002. Cleavage of polycystin-1 requires the receptor for egg jelly domain and is disrupted by human autosomal-dominant polycystic kidney disease 1-associated mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 16981–16986. <https://doi.org/10.1073/pnas.252484899>

Ritter, S.L., Hall, R.A., 2009. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 819–830. <https://doi.org/10.1038/nrm2803>

Sando, R., Jiang, X., Südhof, T.C., 2019. Latrophilin GPCRs direct synapse specificity by coincident binding of FLRTs and teneurins. *Science* 363. <https://doi.org/10.1126/science.aav7969>

Sando, R., Südhof, T.C., 2021. Latrophilin GPCR signaling mediates synapse formation. *eLife* 10, e65717. <https://doi.org/10.7554/eLife.65717>

Silva, J.-P., Lelianova, V.G., Ermolyuk, Y.S., Vysokov, N., Hitchen, P.G., Berninghausen, O., Rahman, M.A., Zangrandi, A., Fidalgo, S., Tonevitsky, A.G., Dell, A., Volynski, K.E., Ushkaryov, Y.A., 2011. Latrophilin 1 and its endogenous ligand Lasso/teneurin-2 form a high-affinity transsynaptic receptor pair with signaling capabilities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 12113–12118. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019434108>

Strokes, N., Piao, X., 2010. Adhesion-GPCRs in the CNS, in: Yona, S., Stacey, M. (Eds.), *Adhesion-GPCRs: Structure to Function*, Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer US, Boston, MA, pp. 87–97. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7913-1_7

Wang, Y., Cao, Y., Hays, C.L., Labouté, T., Ray, T.A., Guerrero-Dado, D., Ahuja, A.S., Patil, D., Rivero, O., Kamasawa, N., Kay, J.N., Thoreson, W.B., Martemyanov, K.A., 2021. Adhesion GPCR Latrophilin 3 regulates synaptic function of cone photoreceptors in a trans-synaptic manner. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 118, e2106694118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2106694118>

Xing, Y., Nakamura, Y., Rainey, W.E., 2009. G Protein-Coupled Receptor Expression in the Adult and Fetal Adrenal Glands. *Mol. Cell. Endocrinol.* 300, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.10.036>

Yang, Li-yun, Liu, X., Yang, Y., Yang, Lin-lin, Liu, K., Tang, Y., Zhang, M., Tan, M., Cheng, S., Xu, Y., Yang, H., Liu, Z., Song, G., Huang, W., 2017. Biochemical features of the adhesion G protein-coupled receptor CD97 related to its auto-proteolysis and HeLa cell attachment activities. *Acta Pharmacol. Sin.* 38, 56–68. <https://doi.org/10.1038/aps.2016.89>

Zuko, A., Oguro-Ando, A., Post, H., Taggenbrock, R.L.R.E., van Dijk, R.E., Altelaar, A.F.M., Heck, A.J.R., Petrenko, A.G., van der Zwaag, B., Shimoda, Y., Pasterkamp, R.J., Burbach, J.P.H., 2016. Association of Cell Adhesion Molecules Contactin-6 and Latrophilin-1 Regulates Neuronal Apoptosis. *Front. Mol. Neurosci.* 9.

