



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

Tesis doctoral

El procesamiento (*splicing*) alternativo de un dominio de 45 amino ácidos en la región carboxilo terminal intracelular determina la señalización dual por proteínas $G\alpha_s$ y $G\alpha_{i/o}$ del receptor latrofilina-1 de la rata

M. en C. JOSÉ CARLOS OVANDO ZAMBRANO

Directores de tesis

Dr. José Antonio Gilberto Arias Montaña

Dr. Antony Boucard Jr.

Ciudad de México

Febrero de 2021

Agradecimientos

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

Al Dr. Benjamín Florán Garduño, al Dr. Ricardo Félix Grijalva, al Dr. Fanis Missirlis y a la Dra. Selma Eréndida Avendaño Vázquez por sus aportaciones y sus consejos para la realización de esta tesis.

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

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

Este estudio fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT); Dr. Antony Boucard Jr. (Subvención para investigadores jóvenes, Ciencia Básica # 221568 y subvención de la Iniciativa Nacional de México [Atención a Problemas Nacionales] # 4687), Premio Munck-Pferfferkorn (Dr. Antony Boucard Jr) y SEP-Cinvestav #233 (Dr. Antony Boucard Jr.), Dr. José Antonio Arias Montaña (Ciencia Básica # 220448) y José Carlos Ovando Zambrano (programa de becas nacionales y mixtas; beca CONACyT # 299057 y # CVU: 559547).

Índice

	Página
Resumen	VI
Summary	VIII
Abreviaturas	IX
1. Introducción	1
1.1 Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs).....	1
1.1.1 Activación de los GPCRs.....	3
1.1.2 Activación de las proteínas G.....	5
1.2 Receptores acoplados a proteínas G de adhesión (aGPCRs).....	6
1.2.1 Latrofilinas.....	8
1.2.1.1 Relevancia de la latrofilina-1 en procesos fisiológicos.....	9
1.2.1.2 Ligandos endógenos de las latrofilinas (teneurinas, neurexinas, FLRT3 y contactina 6).....	13
2. Justificación	20
3. Objetivos	21
3.1 Objetivo general.....	21
3.1.1 Objetivos específicos.....	21
4. Metodología	23
4.1 Generación de los vectores de expresión.....	23
4.2 Transfección celular con polietilenimina (PEI).....	26
4.3 Método alternativo de la transfección celular con PEI	26
4.4 Transfección celular por el método de precipitación del fosfato de calcio.....	27
4.5 Producción y purificación de ligandos endógenos solubles.....	27
4.6 Ensayos de <i>Western Blot</i>	28
4.7 Ensayo de detección del receptor en la superficie celular (DESC).	29
4.8 Ensayo de marcaje de superficie celular.....	30
4.9 Ensayos de saturación de la unión de ligando.....	31
4.10 Anticuerpos utilizados.....	32
4.11 Ensayo de formación de AMPc.....	32
4.11.1 Ensayo de inhibición de la acumulación de AMPc inducida por forskolina.....	34
4.12 Determinación de la concentración intracelular de Ca ²⁺ ([Ca ²⁺] _i) en células HEK-293T en suspensión.....	34
4.13 Ensayo de fosforilación de MAP cinasas (MAPKs)	35
4.14 Análisis del alineamiento de las secuencias.....	36

5. Resultados	38
5.1 Generación de vectores de expresión.....	38
5.2 Obtención de los ligandos endógenos solubles del receptor latrofilina-1.....	39
5.3 Efecto del sitio de procesamiento alternativo B (SSB) en la expresión de la latrofilina-1.....	41
5.4 Interacción de los ligandos solubles endógenos con el receptor latrofilina-1.....	45
5.4.1 Marcaje de superficie celular.....	45
5.4.2 Ensayo de saturación de unión de ligando.....	51
5.5 Efecto de la activación de las variantes de la latrofilina-1 (Lphn-1-SSB, Lphn-1+SSB) en la concentración intracelular de Ca ²⁺ ([Ca ²⁺] _i)	51
5.6 Efecto del SSB en la actividad constitutiva de la latrofilina-1.....	54
5.7 Efecto de la activación por ligandos endógenos de la latrofilina-1 en la formación de AMPc.....	55
5.8 Inhibición de la acumulación de AMPc inducida por forskolina.....	56
5.9 Efecto de la toxina de la <i>Bordetella pertussis</i> (PTX) en la acumulación de AMPc inducida por ligando.....	58
5.10 Efecto de la activación de las variantes de la latrofilina-1 (Lphn-1 ^{-SSB} y Lphn-1 ^{+SSB}) en la fosforilación de las MAP cinasas	59
5.11 Análisis genómico del SSB de la latrofilina-1 de diferentes especies de mamíferos.....	61
6. Discusión	65
7. Conclusiones	73
8. Perspectivas	75
9. Referencias	76

Índice de figuras	Página
Figura 1. Estructura cristalográfica del adrenoceptor β_2 (un GPCR) unido a un agonista total (isoproterenol).....	2
Figura 2. Ciclo de activación e inactivación del adrenoceptor β_2	4
Figura 3. Ciclo de activación e inactivación de las proteínas G heterotriméricas.....	6
Figura 4. Representación esquemática de un aGPCR.....	7
Figura 5. Modelo del mecanismo molecular de activación de los aGPCRs.....	8
Figura 6. Estructura de la latrofilina-1 de la rata.....	9
Figura 7. Expresión de las latrofilinas en mamíferos.....	10
Figura 8. Arquitectura estructural de los dominios de las teneurinas.....	13
Figura 9. Arquitectura estructural de los dominios de la neurexina-1 β	15
Figura 10. Arquitectura estructural de los dominios de la proteína rica en fibronectina-leucina 3 (FLRT3).....	16
Figura 11. Arquitectura estructural de los dominios de la proteína contactina 6.....	17
Figura 12. Complejos moleculares que muestran los dominios de interacción entre la latrofilina-1 y sus ligandos endógenos.....	19
Figura 13. Secuenciación de los plásmidos generados.....	38
Figura 14. Expresión de los ligandos solubles sintéticos de la latrofilina-1 por células HEK-293 transfectadas por los métodos de precipitación por fosfato de calcio y PEI.....	39
Figura 15. Expresión de los ligandos solubles sintéticos por células HEK-293.....	40
Figura 16. Representación esquemática de las variantes Lphn-1 ^{-SSB} y Lphn-1 ^{+SSB} del receptor latrofilina1.....	41
Figura 17. Efecto del SSB en la expresión de la latrofilina-1 en extractos totales de células HEK-293T transfectadas. La expresión fue detectada con un anticuerpo anti-HA.....	42
Figura 18. Efecto del SSB en la expresión de la latrofilina-1 en extractos totales de células HEK-293T transfectadas. La expresión fue detectada con un anticuerpo anti-Flag.....	43
Figura 19. Efecto del SSB en la expresión en la superficie celular de la latrofilina-1 en células HEK-293T transfectadas.....	44
Figura 20. El marcaje de superficie celular muestra la interacción específica de los ligandos endógenos con la variante Lphn-1 ^{-SSB}	46

Figura 21. El marcaje de superficie celular muestra la interacción específica de los ligandos endógenos con la variante Lphn-1 ^{+SSB}	47
Figura 22. El marcaje de superficie celular muestra que el ligando endógeno soluble Ten2 ^{ECD} no se une a la variante Lphn-1 ^{-SSB}	48
Figura 23. Expresión de la Ten2-Myc-8His por células HEK-293 transfectadas con PEI.....	49
Figura 24. El marcaje de superficie celular muestra que el ligando endógeno soluble Ten2 ^{Myc-8His} se une a la variante Lphn-1 ^{-SSB} Venus.....	50
Figura 25. El receptor latrofilina-1 une con alta afinidad a los ligandos endógenos solubles FLRT3 ^{ECD} y Nr1-1 ^{βE}	52
Figura 26. Efecto de la activación de las variantes (Lphn-1 ^{-SSB} , Lphn-1 ^{+SSB}) del receptor latrofilina-1 en la concentración [Ca ²⁺] _i	53
Figura 27. Efecto del SSB en la actividad constitutiva del receptor latrofilina-1.....	54
Figura 28. Efecto de la activación por ligandos endógenos de las variantes Lphn-1 ^{-SSB} (A) o Lphn-1 ^{+SSB} (B) del receptor latrofilina-1 en la formación de AMPc.....	55
Figura 29. Efecto de activación de las variantes (Lphn-1 ^{-SSB} y Lphn-1 ^{+SSB}) del receptor latrofilina-1 en la acumulación de AMPc... ..	57
Figura 30. Efecto de activación de las variantes (Lphn-1 ^{-SSB} y Lphn-1 ^{+SSB}) del receptor latrofilina-1 en la fosforilación de MAP cinasas (ERK-1/2).....	60
Figura 31. Análisis genético del inserto SSB de la latrofilina-1 en el genoma de diferentes mamíferos.....	63
Figura 32. La variante Lphn-1 ^{-SSB} de la latrofilina-1 activa proteínas G _{αi/o}	73
Figura 33. La variante Lphn-1 ^{+SSB} de la latrofilina-1 activa proteínas G _{αs} y G _{αi/o}	74

Resumen

La latrofilina-1 (Lphn-1) es un miembro de la subfamilia de receptores acoplados a proteínas G de adhesión (aGPCR), que participa en la formación de sinapsis mediante interacciones heterofílicas con los ligandos endógenos neurexina-1 β (nrx-1 β), teneurinas (Ten), y la proteína transmembranal rica en fibronectina-leucina 3 (FLRT3).

El gen que codifica la Lphn-1 experimenta dos formas de procesamiento alternativo que pueden afectar su función. El primero (SSA), se ubica entre los dominios lectina y olfatomedina, y regula la afinidad por las teneurinas; el segundo (SSB) se encuentra en el extremo carboxilo terminal. La influencia del SSB en la función del receptor sigue siendo desconocida; sin embargo, por su localización intracelular es probable que el SSB intervenga en la vía de señalización. Por lo tanto, en este trabajo se investigó el efecto del SSB en las propiedades de expresión, unión de ligandos y señalización de la Lphn-1 expresada en células HEK-293T transfectadas.

La inmunodetección de las variantes del receptor Lphn-1 reveló que la inclusión del SSB (Lphn-1^{-SSB} o Lphn-1^{+SSB}) no afectó la expresión, procesamiento o tráfico a la membrana celular, ya que la expresión de ambas proteínas no mostró cambio. Además, los ensayos de unión realizados con los ligandos solubles Nrnx-1 β ^{ECD} y FLRT3^{ECD} mostraron que ambas variantes del receptor SSB poseían propiedades de unión similares.

El efecto del SSB en la señalización intracelular se evaluó determinando la acumulación de AMPc, la concentración intracelular de Ca²⁺, y la fosforilación de las MAP cinasas. Ambas variantes de la Lphn-1 no indujeron movilización de Ca²⁺ ni fosforilación de las MAP cinasas en respuesta a Nrnx-1 β ^{ECD} o FLRT3^{ECD}. En contraste, la variante Lphn-1^{+SSB} aumentó tanto de forma constitutiva como dependiente de ligando la acumulación de AMPc, sin efecto alguno de la variante Lphn-1^{-SSB}. Además, la activación por ligando por ambas variantes (Lphn-1^{-SSB} y Lphn-1^{+SSB}) inhibió la acumulación de AMPc inducida por forskolina, efecto

prevenido por la toxina de *Bordetella pertussis*, indicando la participación de proteínas $G\alpha_{i/o}$.

En conjunto, los resultados de esta tesis indican que el inserto de 45 amino ácidos, producto del procesamiento alternativo en el SSB, confiere a la Lphn-1 la propiedad de señalización dual por proteínas $G\alpha_s$ y $G\alpha_{i/o}$. Estos datos contribuyen a la comprensión de la función de la Lphn-1 en los procesos que conducen a la formación de las sinapsis.

Summary

Latrophilin-1 (Lphn1) is a member of the subfamily of adhesion G protein-coupled receptors (aGPCRs), which participates in synapse formation through heterophilic interactions with the endogenous ligands neurexin-1 β (Nrxn-1 β), teneurins (Ten), and Fibronectin Leucine-rich Repeat Transmembrane protein 3 (FLRT3). The gene encoding Lphn-1 undergoes at least two alternative splicing processes that may affect the protein function. The first one (SSA), is located between the lectin and olfactomedin domains and regulates Lphn-1 affinity for teneurins, whereas the role in receptor function of the second site (SSB), located within the carboxyl-terminal tail, remains unknown. Because of its intracellular location, SSB could affect receptor signaling pathways. In this thesis, we therefore investigated the effect of SSB on the expression, ligand binding and signaling properties of Lphn-1 expressed in transfected HEK-293T cells.

Immunodetection of the SSB variants of the Lphn-1 receptor (Lphn-1^{-SSB} or Lphn-1^{+SSB}) revealed that alternative splicing did not affect receptor expression, processing or trafficking to the cell membrane, since expression levels were similar for both proteins and assays with the soluble ligands Nrxn-1 β ^{ECD} and FLRT3^{ECD} showed similar binding characteristics for both SSB receptor variants.

The effect of SSB on receptor signaling was evaluated by measuring, in the absence or presence of ligands, changes in cAMP accumulation, intracellular Ca²⁺ concentration, and MAP kinase phosphorylation. Both Lphn-1 variants failed to induce Ca²⁺ mobilization or MAP kinase phosphorylation. The Lphn-1^{+SSB} variant increased constitutively and ligand-dependently cAMP accumulation, whereas the Lphn-1^{-SSB} variant had no effect. In addition, ligand-dependent inhibition of forskolin-induced cAMP formation was observed for Lphn-1^{-SSB} and, unexpectedly, also for the Lphn-1^{+SSB} variant. These effects were prevented by *B. pertussis* toxin, indicating the activation of G $\alpha_{i/o}$ proteins.

Taken together, the results of this thesis indicate that SSB provides Lphn-1 dual signaling properties mediated by G α_s and G $\alpha_{i/o}$ proteins. These data contribute to

the understanding of the role of Lphn-1 in the processes that lead to synapse formation.

Abreviaturas

aa	Amino ácidos
AC	Adenilil ciclasa
aGPCRs	Receptores acoplados a proteínas G de adhesión
<i>ADGRL1</i>	Gen del receptor acoplado a proteínas G de adhesión L1
<i>ADGRL2</i>	Gen del receptor acoplado a proteínas G de adhesión L2
<i>ADGRL3</i>	Gen del receptor acoplado a proteínas G de adhesión L3
AMPC	3'-5'-Monofosfato cíclico de adenosina
<i>Cntn-6</i>	Gen de la contactina 6
Cntn-6	Contactina 6
CTF	Fragmento carboxilo terminal
FLRTs	Proteínas transmembranales con repetidos ricos en leucina y fibronectina
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
GPS	Sitio de autoproteólisis de los aGPCR
HA	Hemaglutinina
<i>Lphn1</i>	Gen de la latrofilina-1
<i>Lphn2</i>	Gen de la latrofilina-2
Lphn-1 ^{-SSB}	Variante de la latrofilina-1 sin el inserto SSB
Lphn-1 ^{+SSB}	Variante de la latrofilina-1 con el inserto SSB
NTF	Fragmento amino terminal
Nrxn	Neurexina
PTX	Toxina de la <i>Bordetella pertussis</i>
RGS	Proteína reguladora de la señalización de proteínas G
<i>Splicing</i>	Procesamiento alternativo
SSB	Sitio de procesamiento alternativo B
TCAP	Proteína asociada al carboxilo terminal de las teneurinas
Ten	Teneurina

1. Introducción

Las neuronas son células especializadas, con propiedades de excitación, conducción y plasticidad muy desarrolladas, que sensan el entorno, captan información y la transmiten a otras neuronas y células del organismo para generar una tarea común que se traduzca en una respuesta fisiológica. Para dicha función, las neuronas forman estructuras intercelulares de transmisión de información trans-neural, denominadas sinapsis, que permiten establecer redes de comunicación. La sinapsis está formada por tres componentes principales: 1) un componente pre-sináptico, la terminal sináptica, donde se encuentran vesículas que contienen neurotransmisores; 2) la hendidura sináptica, que separa al componente pre-sináptico del post-sináptico, y a la cual son liberados los transmisores químicos; 3) el componente post-sináptico, que contiene los receptores para los neurotransmisores, entre otras proteínas.

Las moléculas de adhesión celular sinápticas son responsables de eventos que conducen a la formación, estabilidad y mantenimiento de las sinapsis, mediante interacciones homofílicas o heterofílicas, en configuraciones *cis* o *trans*, que confieren a las sinapsis propiedades específicas en función de la posición que ocupan en la red neural (1). Ejemplos de moléculas de adhesión celular sinápticas son las neurexinas, las proto-cadherinas, y las integrinas; sin embargo, las propiedades bioquímicas de este tipo de moléculas no se conocen del todo (2).

1.1 Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs).

Otras moléculas que están involucradas en la formación de las sinapsis son los receptores acoplados a proteínas G, o GPCRs por sus siglas en inglés (*G protein-coupled receptors*). Estas moléculas constituyen una gran familia de proteínas expresadas en la membrana celular (proteínas receptoras transmembranales) que sensan el medio extracelular, activando vías de señalización intracelular en respuesta a estímulos externos. Los ligandos endógenos o exógenos pueden activar a los GPCRs o bien modular su actividad, iniciando o modificando vías de

señalización intracelular. Los GPCRs son el blanco principal de la tercera parte de los medicamentos disponibles en el mercado (3, 4).

Los GPCRs se encuentran constituidos por un dominio amino terminal extracelular variable, siete dominios transmembranales conectados por tres asas extracelulares y tres asas intracelulares, y un dominio carboxilo terminal intracelular. Las estructuras que participan primariamente en el acople a proteínas G son la segunda y la tercera asas intracelulares, los dominios transmembranales 3, 5, y 7, y el dominio carboxilo terminal intracelular (Figura 1) (3, 4, 5).

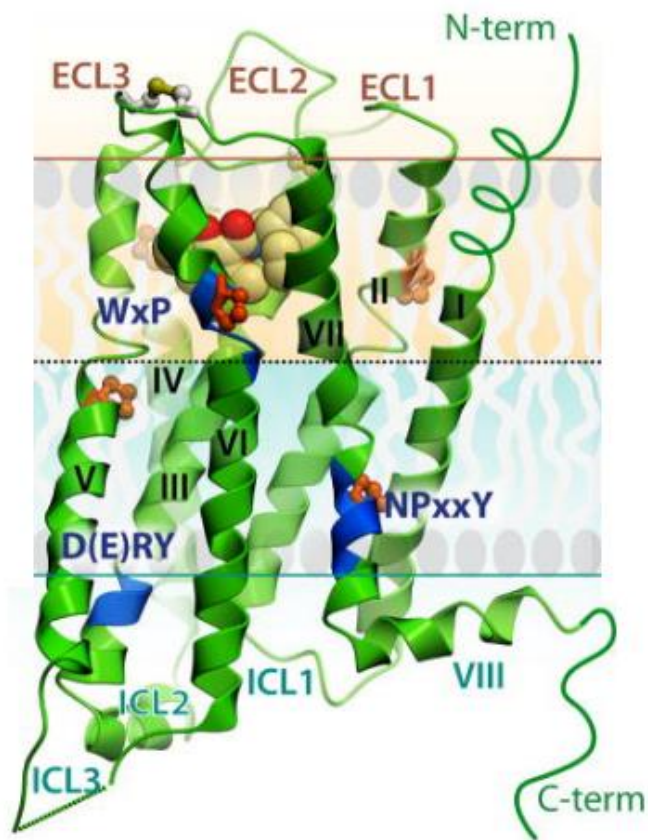


Figura 1. Estructura cristalográfica del adrenoceptor β_2 (un GPCR) unido a un agonista total (isoproterenol).

La leyenda de la figura se presenta en la siguiente página.

Figura 1. Estructura cristalográfica del adrenoceptor β_2 (un GPCR) unido a un agonista total (isoproterenol). En el esquema se indican los diferentes dominios del receptor: los dominios N terminal y C terminal (en letras verde claro), las asas extracelulares (ECL1-3, en letras marrón), los dominios transmembranales (TM I-VII, en letras negras), los dominios amino acídicos conservados (NPxxY, D(E)RY, WxP) en las subfamilias de los GPCRs (en letras azules), y las asas intracelulares (en azul claro). NPxxY: Asparagina-Prolina-x-x-Tirosina; D(E)RY: Aspartato-(Glutamato)-Arginina-Tirosina; WxP: Triptófano-x-Prolina. x puede ser cualquier amino ácido (5).

1.1.1 Activación de los GPCRs

Los GPCRs son considerados moléculas muy dinámicas, ya que pueden adquirir millones de conformaciones en un periodo de tiempo muy corto (Figura 2), estimándose que un cambio conformacional ocurre en órdenes de microsegundos a nanosegundos (3), de acuerdo al modelo del adrenoceptor β_2 , el más ampliamente estudiado. Cuando el agonista se une al receptor, en éste se rompe un cierre iónico formado por la interacción de la secuencia D(E)RY del dominio TM3 y un residuo acídico (Glutamato) del dominio TM6 (5). Como resultado el GPCR se reorganiza estructuralmente (cambio conformacional) activando a la proteína G a la que esté acoplado (6, 67).

El dominio TM6 experimenta un giro de 6-14 Å con respecto al centro del conjunto de dominios transmembranales, acompañado de rotaciones y ligeros movimientos hacia adentro de los dominios TM5 y TM7 (3, 5, 6). Esta acción forma y al mismo tiempo provoca que se expanda la cavidad de inserción de la proteína G que está flanqueada por los dominios TM3, TM5 y TM7, permitiendo una red de interacciones hidrofóbicas de la proteína G con estos dominios transmembranales y la segunda y tercera asas intracelulares. La cesta de unión del ligando también se reorganiza, con una reducción del tamaño por contracción de los dominios TM5 y TM6 en la parte superior del receptor.

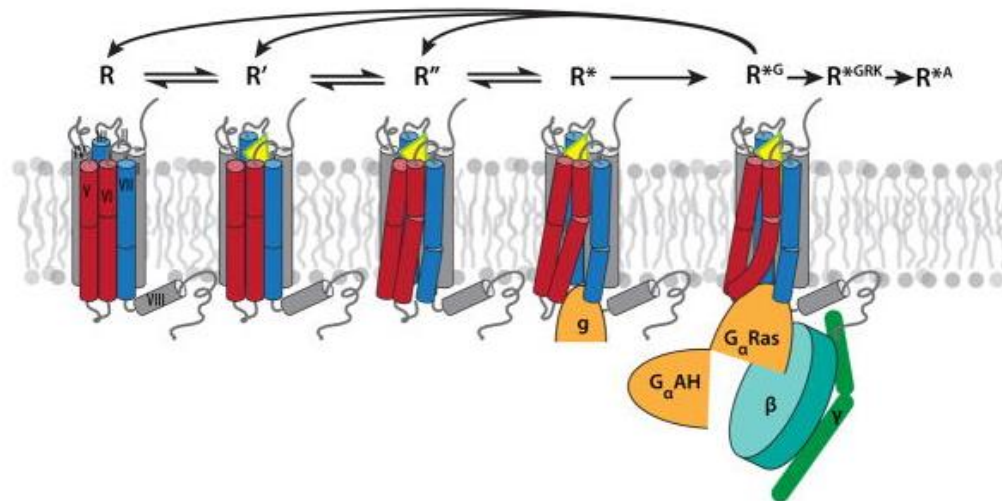


Figura 2. Ciclo de activación e inactivación del adrenoceptor β_2 . La representación esquemática muestra los distintos estados conformacionales del receptor, debidos a diferentes niveles energéticos. R representa estados inactivos, R' representa estados inactivos unidos a agonistas neutros, y R'' representa estados activados unidos a agonistas totales, caracterizados por una reordenación global sustancial de las hélices y los micro-interruptores de cadena lateral en la región intracelular que exponen, al menos parcialmente, la cavidad de unión a la proteína G. R* representa los sub-estados activados unidos a agonistas con la inserción inicial de la hélice α del carboxilo terminal de la subunidad α de la proteína G en la cavidad intracelular. Finalmente, R*G es una conformación distintiva de señalización por proteínas G de un receptor, que se adquiere por activación del complejo GPCR- $G\alpha\beta\gamma$. Pueden existir otros estados activos conformacionalmente distintos en los que el receptor se encuentra unido a cinasas de GPCRs (GRKs; R*^{GRK}) unido a β -arrestinas (R*^A). El ligando se representa en amarillo (5).

Lo anterior ha sido confirmado por estudios de cristalografía y simulaciones mediante algoritmos matemáticos que muestran que la reorganización de varios residuos en la región de transmisión (región conectora entre la cesta de unión del ligando y la parte intracelular del receptor), induce cambios conformacionales en la cesta de unión y en la cavidad de acople a la proteína G. Como resultado del movimiento hacia adentro del dominio TM5, en el adrenoceptor β_2 la Isoleucina³⁴⁰ se aleja de su posición, separando a la Prolina⁵⁵⁰ y la Fenilalanina⁶⁴⁴ (unidas en el estado inactivo), permitiendo así que la mitad inferior del dominio TM6 se mueva

hacia afuera (3, 5, 6). Una red alostérica de residuos entre los dominios TM5 y TM7 forma interacciones polares características del estado activo (3, 67). Una vez activados, los GPCRs desencadenan vías de señalización mediante mecanismos dependientes de proteínas G y o bien de las proteínas β -arrestinas.

1.1.2 Activación de las proteínas G

Las proteínas G conforman una familia de proteínas efectoras que unen nucleótidos de guanina (GTP y GDP), y que desempeñan un papel muy importante en la señalización intracelular. Estructuralmente estas proteínas se clasifican en monoméricas y heterotriméricas. Las proteínas G monoméricas están constituidas por solo una unidad y se encuentran libres en el citosol o el nucleoplasma, mientras que las proteínas G heterotriméricas están conformadas por 3 subunidades distintas (α , β , γ), y se encuentran ancladas a la membrana citoplasmática mediante la subunidad α , aunque no son proteínas integrales. Se conocen al menos 20 subunidades α , 6 subunidades β y 11 subunidades γ (7, 3), y dependiendo de la subunidad α las proteínas G se clasifican en 4 familias principales: G_{α_s} , $G_{\alpha_{i/o}}$, $G_{\alpha_q/11}$ y $G_{\alpha_{12/13}}$ (8).

Una vez que el receptor es activado se genera un cambio conformacional en su estructura que induce la apertura de la cavidad de acople a la proteína G, provocando además un efecto de resonancia química que afecta los dominios amino y carboxilo terminal de la subunidad G_{α} . En este paso la subunidad G_{α} se reorganiza estructuralmente, lo que permite que la hélice 5α del dominio carboxilo terminal forme una red de interacciones hidrofóbicas con los dominios TM 3, 5, y 7 del receptor; el intercambio de GDP por GTP ocurre por la rotación de ~ 60 Å por parte de la hélice α_5 . Este movimiento a su vez provoca que también el dominio AH y el N terminal de la subunidad G_{α} pierdan interacción con las asas intracelulares 2 y 3, generando que la estructura de la subunidad G_{α} se flexibilice y permitiendo que en el dominio de unión de nucleótidos se intercambie GDP por GTP, activando así a la proteína G (7, 67).

cual promueve que el receptor se escinda en dos fragmentos: el NTF formado por el dominio N-terminal extracelular, y el CTF conformado por la secuencia Stachel, los siete dominios transmembranales y el dominio carboxilo terminal intracelular, como se ilustra en la Figura 4 (10-13).

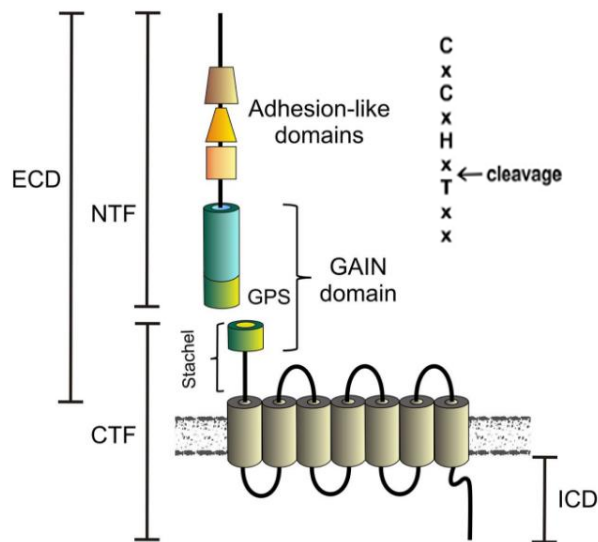


Figura 4. Representación esquemática de un aGPCR. Se denotan las características principales de estas proteínas como el dominio GAIN, que a su vez contiene la región GPS (sitio de auto-proteólisis del receptor), la secuencia Stachel y los múltiples dominios de adhesión (13).

Un posible mecanismo de activación descrito para los aGPCRs implica que la unión del ligando al receptor en el dominio amino terminal induzca cambios conformacionales en el dominio GPS, que a su vez disminuyan las fuerzas electrostáticas que mantiene asociados el NTF y el CTF en la superficie celular, provocando que ambos fragmentos se separen, liberando así al NTF y exponiendo a la secuencia Stachel del receptor. La secuencia Stachel experimentaría cambios

conformacionales que le permitirían unirse a la parte extracelular del receptor y activarlo, como se ilustra en la Figura 5 (14).

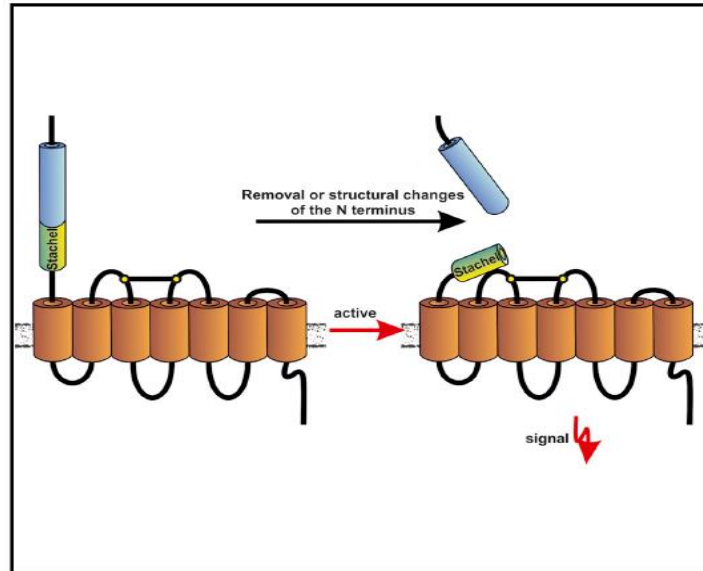


Figura 5. Modelo del mecanismo molecular de activación de los α GPCRs (14).

1.2.1 Latrofilinas

Dentro de la subfamilia de α GPCRs se encuentran receptores que contienen dominios de lectina y olfatomedina, incluyendo a las latrofilinas (Lphn). Estos receptores se forman por $\sim 10,000$ amino ácidos (aa), y poseen un dominio amino terminal extracelular de gran tamaño que a su vez se constituye por: a) un dominio de lectina; b) un dominio olfatomedina; c) una región rica en residuos de Serina y Treonina; y d) el dominio GAIN, que contiene el dominio GPS (motivo corto que representa un sitio de auto-proteólisis), donde el receptor es cortado para generar los fragmentos NTF y CTF, y también donde es liberada la secuencia Stachel (Figura 6). Poseen además siete dominios transmembranales enlazados por tres asas extracelulares y tres asas intracelulares, y un dominio carboxilo terminal intracelular con una región de unión a dominios PDZ (10, 11).

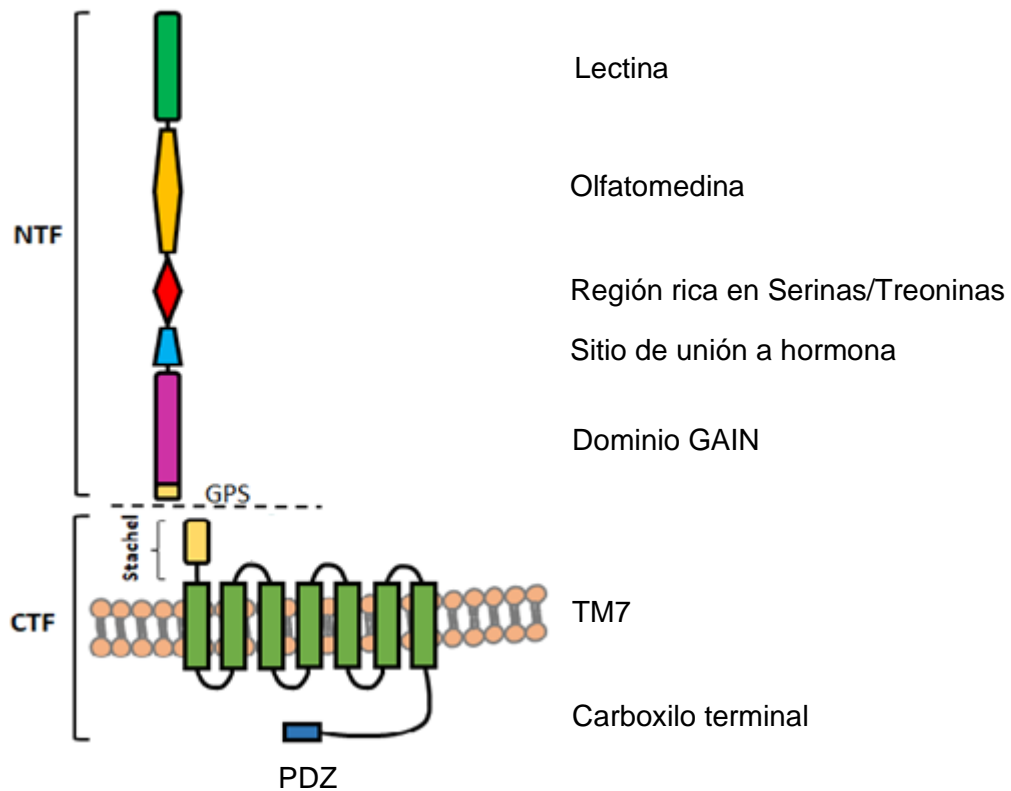


Figura 6. Estructura de la latrofilina-1 de la rata. La representación muestra cada uno de los dominios estructurales de la proteína.

1.2.1.1 Relevancias de la latrofilina-1 en procesos fisiológicos

Las latrofilinas se han identificado como proteínas de unión a α -latrotoxina, una potente toxina componente del veneno de la araña “viuda negra”. La unión de la α -latrotoxina a las latrofilinas promueve la liberación masiva de neurotransmisores como acetilcolina, norepinefrina y ácido γ -aminobutírico (GABA) en las terminales nerviosas (10, 15, 16).

Las latrofilinas se expresan pre- y post-sinápticamente (17, 18, 29). Las evidencias que apoyan una localización pre-sináptica provienen de estudios de inmunotinción, microscopía electrónica y de fraccionamiento celular (17), y la localización post-sináptica es apoyada por el análisis proteómico de la densidad

post-sináptica y datos de fraccionamiento celular (18, 19). La unión de las latrofilinas a las proteínas de andamiaje molecular de la densidad post-sináptica también apoya una ubicación post-sináptica (19, 20).

A la fecha se han descrito tres isoformas de las latrofilinas de los mamíferos (latrofilina-1, latrofilina-2 y latrofilina-3), codificadas por tres genes diferentes (*Lphn1/ADGRL1*, *Lphn2/ADGRL2* y *Lphn3/ADGRL3*). Las tres latrofilinas se expresan de forma ubicua, pero la latrofilina-1 y la latrofilina-3 se expresan abundantemente en el sistema nervioso central (SNC), como se muestra en la Figura 7 (10, 21).

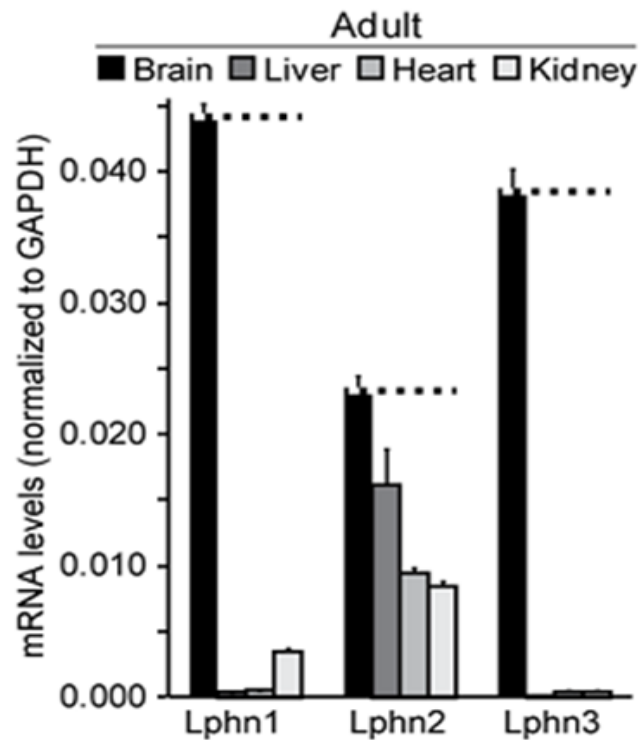


Figura 7. Expresión de las latrofilinas en los mamíferos. Cuantificación por RT-PCR del ARNm de latrofilina-1, latrofilina-2 y latrofilina-3 en el cerebro, hígado, corazón y riñón del ratón (21).

En este trabajo se abordó el estudio de la latrofilina-1, para la cual se ha descrito un sitio de procesamiento (*splicing*) alternativo (sitio A) en su región extracelular, y un segundo sitio en la región intracelular (sitio B), que pueden generar isoformas con funciones diferentes. El primer sitio se localiza en la secuencia del gen que codifica la región ubicada entre los dominios lectina y olfatomedina, y el procesamiento alternativo se refleja en la inserción de 5 aa (10, 21-23), lo que modifica la afinidad del receptor por las teneurinas, un grupo de ligandos. El segundo sitio de procesamiento alternativo se localiza en la secuencia del gen que codifica la región ubicada entre el séptimo dominio transmembranal y el dominio de unión al dominio PDZ, y el proceso resulta en la inserción de 45 aa (10). Sin embargo, no se conoce su efecto en la función del receptor.

Los ratones *knockout* de latrofilina-1 muestran deterioro de la capacidad de respuesta a la α -latrotoxina y ausencia del apego maternal de las hembras por sus crías, lo que sugiere que la función de esta proteína no puede ser suplida por otra (24). En *C. elegans* se expresan Lat-1 y Lat-2, receptores homólogos de la latrofilina-1 y la latrofilina-2 de los mamíferos. La primera es indispensable para la alineación correcta de los planos anterior y posterior en la división celular durante la formación del blastómero, ya que la ausencia de la proteína conduce a la pérdida de la polaridad celular, por lo que se le ha relacionado con un desarrollo embrionario adecuado (25, 26).

Mutaciones en los genes que codifican las latrofilinas (*Lphn2* y *Lphn1*) también se han relacionado con la susceptibilidad al desarrollo de cáncer de mama en humanos (27, 28). Sin embargo, la función de las latrofilinas 1 y 2 en el ciclo celular aún no está clara, pero su implicación en la división celular asimétrica es evidente en la embriogénesis de *C. elegans* (25). Estudios con *D. melanogaster knockout* de dCirl, expresado por este organismo y la única proteína equivalente a las latrofilinas de los mamíferos, muestran que esta proteína es necesaria en las neuronas cordotónicas para una adecuada sensibilidad al tacto suave y la retroalimentación propioceptiva durante la locomoción de las larvas, indicando que participa en la percepción de los estímulos mecanosensoriales (29, 30). Además, en células

COS-7 co-transfectadas con dCirl y una proteína G quimérica recombinante (proteína $G_{\alpha q/11}$ a la cual se le substituyen 4 aa en el dominio carboxilo terminal por los aa correspondientes de una proteína $G_{\alpha i/o}$), un péptido sintético diseñado a partir de la secuencia Stachel induce la formación de fosfatos de inositol (IPs), indicando la activación de proteínas $G_{\alpha i/o}$ (30).

En células COS-7 co-transfectadas con una proteína $G_{\alpha q/11}$ quimérica (con substitución de los 4 últimos aa por los correspondientes a una proteína $G_{\alpha s}$), la latrofilina-1 de la rata y Lat-1 de *C. elegans* activan proteínas $G_{\alpha s}$, tanto de manera constitutiva como al ser activadas por un péptido sintético diseñado a partir de la secuencia Stachel (31). Sin embargo, se ha reportado que la latrofilina-1 de la rata también activa proteínas $G_{\alpha i/o}$, ya que en ensayos de acumulación de AMPc en células HEK-293 transfectadas con el receptor se observó disminución de la acumulación de este segundo mensajero, constitutivamente y al estimular al receptor con el péptido sintético diseñado a partir de la secuencia Stachel, efectos prevenidos por el tratamiento de las células con la toxina de *Bordetella pertussis* (32). Estos resultados sugieren que la latrofilina-1 de la rata puede activar tanto proteínas $G_{\alpha s}$ como $G_{\alpha i/o}$; sin embargo, no es claro qué variantes de la latrofilina-1 fueron empleadas en estos estudios y el posible mecanismo.

Las células pancreáticas β de ratón expresan a la latrofilina-1 y la latrofilina-3, y la activación de estos receptores modula la liberación de insulina, si bien la latrofilina-1 lo hace activando proteínas $G_{\alpha s}$, y la latrofilina-3 activando proteínas $G_{\alpha i/o}$ (33). Sin embargo, en estudios de espectrofluorometría con células de neuroblastoma de ratón y neuronas de hipocampo que expresan endógenamente la latrofilina-1, incubadas con teneurina-2 (ligando endógeno) o α -latrotoxina recombinante (incapaz de inducir la formación de poros), se observó un aumento en la concentración intracelular de calcio, lo que sugiere que el receptor activa proteínas $G_{\alpha q/11}$ (34).

Por otra parte, la sobre-expresión de la latrofilina-1 en neuronas del hipocampo de la rata induce una marcada disminución de las espinas dendríticas, y su transfección

en células HEK-293T induce cambios en su morfología, conduciendo a la pérdida de las proyecciones membranales de estas células. Estos resultados sugieren que la latrofillina-1 puede inducir efecto en el remodelado del citoesqueleto de actina activando proteínas $G_{\alpha_{12/13}}$ (35).

1.2.1.2 Ligandos endógenos de las latrofilinas (teneurinas, neurexinas, FLRT3 y contactina 6)

Se han caracterizado como ligandos endógenos de la latrofilina-1 a las teneurinas (Ten 1-4), las neurexinas (α y β), las FLRTs (FLRT 1-3) y la contactina 6 (17, 21, 36).

Teneurinas

Son proteínas transmembranales glicosiladas tipo II de ~2,800 residuos (Figura 8), que forman homodímeros mediante puentes disulfuro, tienen una región citoplasmática N-terminal relativamente corta, una región única transmembranal (TMR), y una secuencia extracelular larga que contiene ocho repeticiones de un dominio EGF (*epidermal growth factor-like domain*), una región conservada de 17 repeticiones de Cisteínas, múltiples repeticiones YD, y al final el dominio TCAP o dominio asociado al dominio carboxilo de la teneurina, importante para la interacción con las latrofilinas (21, 37, 38).

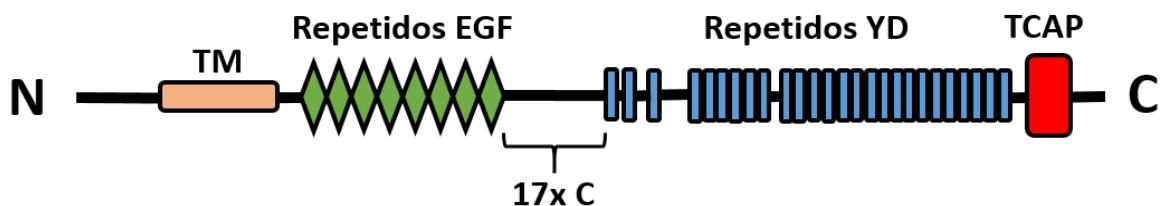


Figura 8. Arquitectura estructural de los dominios de las teneurinas.

Las teneurinas son codificadas por tres genes diferentes (*ten1-4*) que dan origen a variantes también diferentes (teneurina 1-4). De las cuatro variantes de las teneurinas, la teneurina-2 presenta la mayor afinidad (constante de disociación, K_d , 0.4 nM) por las latrofilinas (21). La relevancia de estas proteínas ha sido evidenciada por su participación en la promoción del crecimiento de neuritas, la adhesión celular, la morfología dendrítica y la formación de las sinapsis. Aunque la función molecular de la mayoría de las teneurinas en la adhesión celular no se conoce del todo, *in vitro* estas proteínas participan en la formación de sinapsis por sus interacciones heterofílicas con las latrofilinas (17, 39). En neuronas del hipocampo de ratón la latrofilina-1, localizada pre-sinápticamente, y la teneurina-2, ubicada post-sinápticamente, forman complejos trans-sinápticos que regulan la formación o el mantenimiento de las sinapsis (17). En el ratón, la supresión de la teneurina-3 altera la guía axonal en el sistema visual e induce una inadecuada focalización de los axones de las neuronas que proyectan de la retina al núcleo geniculado y al colículo superior (40, 41), y la supresión de teneurina-4 afecta la diferenciación de los oligodendrocitos y la mielinización en el SNC (42).

Por otra parte, estudios recientes de co-inmunoprecipitación, cristalización y resonancia de plasmón superficial indican que la teneurina-2 puede interactuar con FLRT3 y las latrofilinas 1-3 al formar complejos ternarios formados por el dominio t-CAP de la teneurina-2, el dominio lectina de las latrofilinas y la región de repetidos de leucina de FLRT3, de manera tal que la latrofilina interactúa simultáneamente con las dos proteínas para formar dicho complejo, que se propone participa en el desarrollo de las sinapsis (43).

Neurexinas

Otros ligandos de la latrofilina-1 son las neurexinas, proteínas pre-sinápticas transmembranales tipo 1, codificadas por tres genes homólogos (*nrxn* 1-3) que originan dos isoformas principales, una larga (α -neurexina) y una corta (β -neurexina) (44). De manera similar a la latrofilina-1, estas proteínas son receptores de la α -latrotoxina (45, 46). Tanto las neurexinas como la latrofilina-1 se purificaron por cromatografía de afinidad por la α -latrotoxina a partir de extractos de

cerebro de la rata, observándose dos bandas, una correspondiente a neurexina y la segunda a la latrofilina-1.

La neurexinas-1 β en conjunto con la latrofilina-1 pueden ser responsables de la liberación masiva de neurotransmisores por exocitosis desencadenada por la α -latrotoxina, cuando se expresan en células neuroendocrinas transfectadas (10, 15). Ambas isoformas de la neurexina comparten la misma región carboxilo terminal intracelular corta y un solo paso transmembranal, pero la región amino terminal extracelular de la α -neurexina contiene seis repeticiones de LNS (*Laminin G-like domain*) y tres repetidos de EGF (*epidermal growth factor-like domain*), mientras que la β -neurexina solo contiene un repetido LNS en el dominio N terminal (Figura 9); de estas isoformas la β -neurexina presenta mayor afinidad (K_d 48.6 nM) por la latrofilina-1 (22).

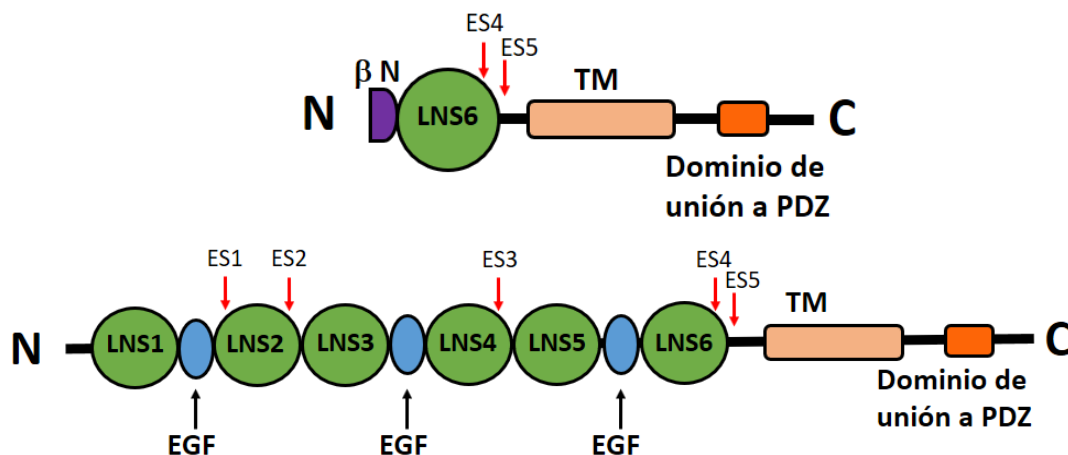


Figura 9. Arquitectura estructural de los dominios de la neurexina-1 β (imagen superior), y de la neurexina 1 α (imagen inferior). Las flechas rojas indican los sitios de procesamiento alternativo.

Una característica distintiva de las neurexinas es su propensión a un gran número de eventos de procesamiento (*splicing*) alternativo, que pueden generar más de 3,000 variantes distintas con funciones diferentes, convirtiéndolas en proteínas polimórficas (44). La α -neurexina posee cinco formas de procesamiento alternativo (ES1-ES5) y la β -neurexina dos formas (ES4 y ES5), y de éstas ES4 regula la interacción con la latrofilina-1. Se ha reportado que la unión latrofilina-neurexina estabiliza las uniones célula-célula en una configuración *trans*, pero también es posible que estas proteínas interactúen en configuración *cis*, dada la presencia conjunta de latrofilina-1 y neurexinas en la membrana pre-sináptica (24).

Proteínas transmembranales ricas en fibronectina-leucina (FLRTs)

Las FLRTs se han descrito como ligandos endógenos de la latrofilina-1 y son proteínas transmembranales post-sinápticas glicosiladas que en su región amino terminal extracelular contienen un dominio fibronectina tipo III, seguido de diez repeticiones ricas en lectina flanqueadas por un residuo de Cisteína, un dominio transmembranal y una cola carboxilo terminal intracelular corta (Figura 10). En vertebrados existen tres isoformas de FLRT, codificadas por genes diferentes (*Flrt1-3*), que se expresan ampliamente en todos los tejidos (47, 48).

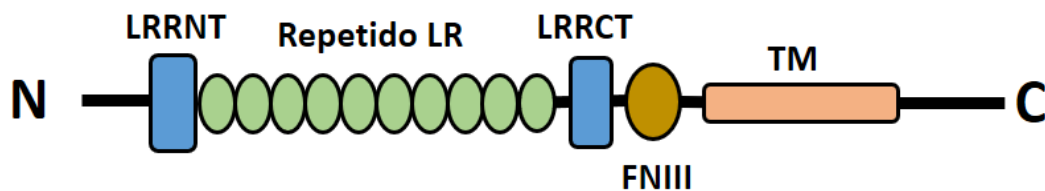


Figura 10. Arquitectura estructural de los dominios de la proteína rica en fibronectina-leucina 3 (FLRT3).

En el sistema nervioso, FLRT3 participa en la formación de complejos trans-sinápticos mediante su interacción heterofílica de alta afinidad (K_d 0.46 nM) con latrofilina-1 y latrofilina-3 (21, 47). Además, desempeña una función importante en el desarrollo de las sinapsis glutamatérgicas y la regulación de las sinapsis excitadoras *in vitro* e *in vivo* (47). La FLRT3 también se une heterofílicamente a los receptores de guía axonal Unc5B y Unc5d, lo que promueve el direccionamiento axonal a través de la atracción o repulsión durante la formación y el establecimiento de la sinapsis (49, 50).

Las funciones en las que se ha involucrado a las FLRTs, se extienden a la señalización del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y la adhesión celular durante el desarrollo embrionario (21, 51, 52), y estudios recientes han mostrado que FLRT2 y FLRT3 son esenciales en este proceso y probablemente necesarias para el desarrollo normal del tejido cardíaco (52, 53).

Contactinas

Otro ligando endógeno de la latrofilina-1 descrito recientemente es la contactina 6 (36), codificada por el gen *Cntn-6*, y que pertenece a la súper familia de las inmunoglobulinas. Es una proteína neuronal anclada a la membrana por glicosilfosfatidilinositol (GPI), y funciona como una molécula de adhesión celular. Contiene en la parte extracelular cuatro dominios de fibronectina tipo III, seguidos de seis dominios semejantes a inmunoglobulinas (Figura 11).

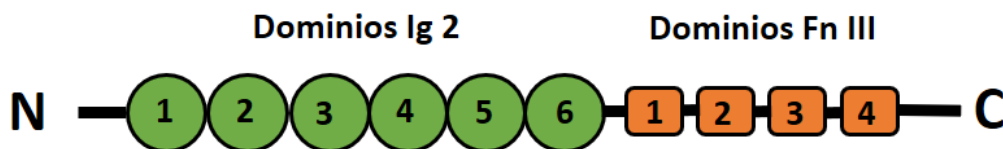


Figura 11. Arquitectura estructural de los dominios de la proteína contactina 6.

La contactina 6 participa en el desarrollo del SNC, ya que los ratones *knockout* de *Cntn-6* muestran disminución de la coordinación motora, retraso en el desarrollo del tracto cortico-espinal, desorientación de las dendritas apicales de las neuronas de la lámina V de la corteza visual y aumento de la muerte neuronal durante el desarrollo (54, 55). Estos animales muestran también disminución de la formación de sinapsis glutamatérgicas, indicando que la contactina 6 regula la sinaptogénesis en el cerebelo y el hipocampo (55).

Recientemente se ha evidenciado que la contactina 6 tiene un efecto regulador de la latrofilina-1, al interactuar heterofílicamente con esta proteína; en cultivos de neuronas corticales del ratón que sobre-expresan la latrofilina-1, la co-transfección de la contactina 6 previene la apoptosis y el cambio morfológico inducido por latrofilina-1 (36).

Interacción de la latrofilina-1 y sus ligandos endógenos

La latrofilina-1 es una molécula de adhesión celular que interactúa en configuración *trans* con ligandos endógenos teneurinas (dominio lectina), neurexinas (dominios olfatomedina), FLRTs (dominio olfatomedina) y contactina 6 (dominio amino terminal), como se ilustra en la Figura 12 (56); además, los reportes sobre la señalización de la latrofilina-1 muestran datos contrastantes o controversiales, por lo que se requiere definir el mecanismo de señalización para la mejor comprensión de la información disponible hasta ahora.

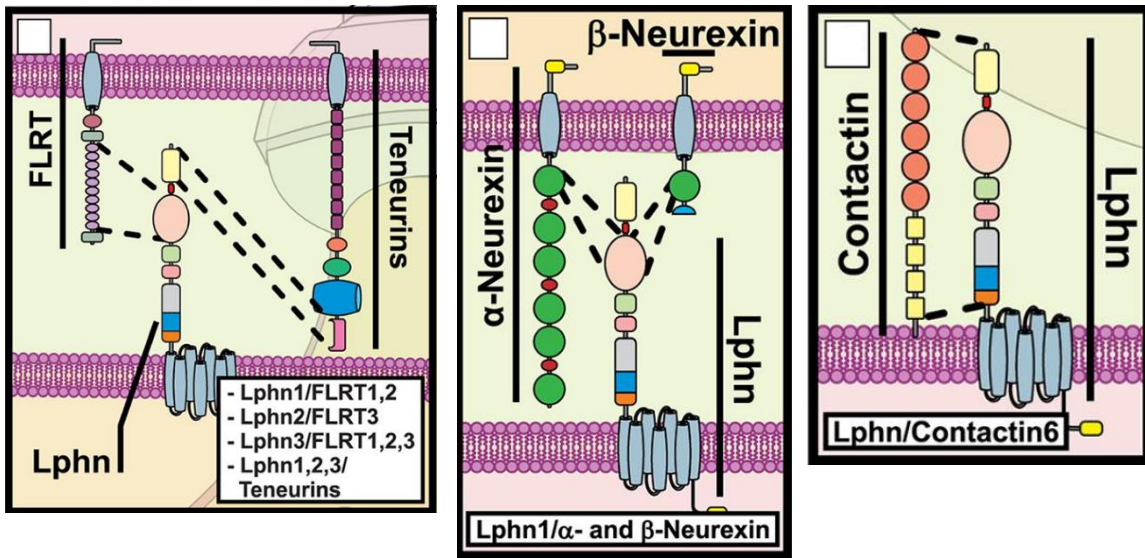


Figura 12. Complejos moleculares que muestran los dominios de interacción entre la latrofilina-1 y sus ligandos endógenos (56).

2. Justificación

Las moléculas de adhesión celular sinápticas son relevantes para la conectividad neural, y la latrofilina-1 se ha descrito como un receptor acoplado a proteínas G de la subfamilia de receptores a moléculas de adhesión celular (aGPCRs), con base en la similitud estructural con los miembros que conforman esta familia.

La latrofilina-1 contiene dos sitios de procesamiento alternativo. El primero (sitio A), está localizado en la secuencia del gen que codifica la región entre el dominio lectina y olfatomedina y conduce a la inserción de 5 aa. Este sitio de procesamiento alternativo regula la afinidad por uno de sus ligandos endógenos, la teneurina. El segundo sitio (B), se localiza en la secuencia del gen que codifica la región entre el séptimo dominio transmembranal y el dominio de unión a dominios PDZ, e induce la inserción de 45 aa; sin embargo, no se ha descrito la importancia de este inserto en la función del receptor.

La latrofilina-1 se expresa pre- y post-sinápticamente, e interacciona con las proteínas de un solo dominio transmembranal teneurina-2 y FLRT3, que se expresan en la membrana post-sináptica, y con la proteína neurexina 1 β , expresada en la membrana pre-sináptica. La teneurina-2, la neurexina-1 β y FLRT3 son importantes en la formación, la especificidad y estabilidad de las sinapsis, por lo que mediante interacciones con estas proteínas la latrofilina-1 podría participar en la formación, el mantenimiento y la especificidad sináptica a través de la señalización intracelular generada por su activación.

Sin embargo, a la fecha no se ha establecido con certeza el perfil de señalización intracelular que promueve la activación de la latrofilina-1 por ligandos endógenos (teneurina-2, FLRT3 y neurexina-1 β), y tampoco se ha descrito el impacto del sitio de procesamiento alternativo SSB en la función del receptor.

Por lo anterior, dilucidar la señalización del receptor latrofilina-1 y el efecto del SSB en dicha señalización, permitirá ampliar la comprensión de la participación de la latrofilina-1 en los procesos que conducen a la conectividad neuronal.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Determinar el efecto del evento de procesamiento alternativo SSB en la activación del receptor Latrofilina-1, expresado en células HEK-293T, evaluando la señalización por proteínas $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$ y $G\alpha_{q/11}$.

3.1.1 Objetivos específicos

1. Diseñar estrategias moleculares para inducir la expresión en un sistema heterólogo de formas solubles de los ligandos endógenos (neurexina1 β , teneurina-2 y FLRT3) del receptor latrofilina-1, y purificar estas proteínas recombinantes.
2. Evaluar el efecto de la inserción de 45 aa, producto del procesamiento alternativo en el SSB, en la expresión del receptor latrofilina-1.
3. Determinar la interacción ligando-receptor y caracterizar la afinidad del receptor por ligandos endógenos, mediante ensayos de marcaje de superficie celular y ensayos de saturación de la unión de ligando.
4. Determinar el acople de las dos variantes del receptor latrofilina-1 a proteínas $G\alpha_{q/11}$, evaluando si su activación aumenta la concentración intracelular de calcio, y el efecto del procesamiento alternativo B (SSB) en dicha señalización.
5. Evaluar el acople de las dos variantes del receptor latrofilina-1 a proteínas $G\alpha_s$ o $G\alpha_{i/o}$, evaluando la acumulación de AMPc (estimulación o inhibición, respectivamente) de forma constitutiva o estimulada por ligandos, así como el efecto del procesamiento alternativo B (SSB) en la señalización.

6. Dilucidar el efecto de la activación de las dos variantes del receptor latrofilina-1 en la fosforilación de MAP cinasas, así como el efecto del procesamiento alternativo B (SSB) en la señalización.

4. Metodología

4.1 Generación de los vectores de expresión

A partir de los plásmidos *pCMV-CL1AAFlag-HA*, *pCMV-CL1ABFlag-HA*, *pCMV-Ig neurexina-1 β* generados previamente (10, 11, 22), se obtuvieron nuevas construcciones para expresar de forma eficiente las dos isoformas del receptor latrofilina-1, así como producir sus ligandos endógenos solubles, que corresponden a la región extracelular de teneurina 2, neurexina-1 β y FLRT3. Para la purificación e inmunodetección eficientes, a estas proteínas se les insertó la secuencia de la Fc Ig humana y una bandera de 8 residuos de Histidina en el extremo amino.

Generación de *pCMV-Ig neurexina-1 β -NheI*. Para la generación de los ligandos endógenos solubles se partió del plásmido *pCMV-Ig neurexina-1 β* que contiene el péptido señal de la neurexina-1 β , seguido de la secuencia extracelular de la neurexina-1 β y al final de ésta la secuencia de la Fc de la Ig G humana. Se emplearon dos pares de oligonucleótidos; el primer par flanquea la secuencia del péptido señal y la secuencia que codifica la parte extracelular de la neurexina-1 β (sentido: gatacgcgtatcgataag; antisentido: acgctgcgactcagttgtc), y el segundo par inserta el sitio de reconocimiento de la endonucleasa NheI entre el péptido señal y la secuencia que codifica la proteína (sentido: acgctagccccccaggccac; antisentido: gatgctagcgatccagtttgga).

Empleando la técnica de PCR de extensión sobrepuesta se generaron tres fragmentos: el primero comprende los nucleótidos 858-1108; el segundo los nucleótidos 1105-1787, y el tercero fue generado por la sobre-posición del primer y el segundo fragmentos en una tercera reacción de PCR. De esta manera se obtuvo el fragmento de clonación (BglII-Sall, nucleótidos 926-1785), que fue clonado en el plásmido *pCMV-Ig neurexina-1 β* empleando las endonucleasas BglII y Sall, en conjunto con la T4 DNA ligasa.

Generación de *pCMV-IgTen2*. Para la teneurina 2 soluble se partió del plásmido pcDNA3-LassoB-Flag-Myc que contiene el péptido señal de la latrofilina-1, seguido

de una bandera Flag, la secuencia extracelular de la teneurina 2 y al final de ésta la secuencia de Myc.

Se diseñaron dos oligonucleótidos (sentido: tagcgctagcgcggtatttcatagcaatgcatctg; antisentido: cgacgtcgactcccatctcattctgtcttaaaaactg) para amplificar por PCR la región del plásmido que contiene la bandera, la región extracelular de la teneurina 2 (nucleótidos 922-8125), y se insertó un sitio de reconocimiento para la endonucleasa NheI en un extremo del amplicón mientras que en el otro extremo se insertó el sitio de corte de la endonucleasa Sal I, generando el fragmento NheI-SalI de 7115 pb. Posteriormente se utilizó como vector el plásmido *pCMV-Ig neurexina-1 β -NheI* (previamente generado), el cual fue cortado con las mismas enzimas (NheI-SalI) y se insertó el fragmento de subclonación utilizando la T4 ADN ligasa.

Generación de *pCMV-IgFLRT3*. Para generar FLRT3 soluble se utilizó el plásmido pDisplay FLRT3, que contiene el péptido señal de la inmunoglobulina κ , una bandera hemaglutinina (HA) seguida de la secuencia extracelular de FLRT3, una bandera Myc y el dominio transmembranal del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar por PCR la región del plásmido que contiene la región extracelular de FLRT3 (nucleótidos 47-547; sentido: tagcgctagctcctgccatctgtgtgtcgc; antisentido: cgacgtcgaccaaaggtaaatttgggttttgaagg), y se insertó un sitio de reconocimiento para la endonucleasa NheI en el extremo 5' del amplicón y en el extremo 3' se insertó el sitio de corte de la endonucleasa Sal I, generando el fragmento NheI-SalI de 1637 pb. Se utilizó como vector el plásmido *pCMV-Neurexina-1 β -NheI* (previamente generado), que fue cortado con las mismas enzimas (NheI-SalI) para insertar el fragmento de subclonación utilizando la T4 ADN ligasa.

Generación de *pCMV-Ten2-8xHis*. Para la teneurina2 soluble se partió del plásmido *pcDNA3-LassoB-Flag-Myc* que contiene el péptido señal de la latrofilina 1, seguido de una bandera Flag, la secuencia extracelular de la teneurina 2 y al final de ésta la secuencia de Myc.

Se diseñaron oligonucleótidos (sentido: tatagctagcgcgattacaaggatgacgacgataaa; antisentido: atatgtcgactcagtggtggtgatggtgatgatgtctagagctattcagatcctc) para amplificar por PCR la región del plásmido que contiene la bandera de Flag, la región extracelular de la teneurina 2 (nucleótidos 922-8125) y Myc, y se insertó un sitio de reconocimiento para la endonucleasa NheI en el extremo 5' del amplicón y en el extremo 3' se insertó una bandera de 8 residuos de Histidina, seguida de un codón de paro y al final un sitio de reconocimiento para la endonucleasa Sal I, generando el fragmento NheI-SalI de 7229 pb. Posteriormente el plásmido *pCMV-IgFLRT3* fue digerido por las mismas enzimas (NheI-SalI), se removió el fragmento que contenía a FLRT3 y el fragmento generado previamente fue clonado utilizando la T4 ADN ligasas.

Para la generación de neurexina 1- β soluble, se partió del plásmido *pCMV-N1 β -1 Flag*, que contiene la secuencia extracelular soluble de la neurexina 1- β fusionada a la fracción constante de la IgG humana. Esta construcción fue generada previamente (22, 57).

Los oligonucleótidos utilizados en la generación de las construcciones plasmídicas se enlistan en la Tabla 1.

Tabla.1 Oligonucleótidos usados para generar las construcciones plasmídicas utilizadas.

Plásmido generado	Nombre	Secuencia	Orientación
pCMV-Ig neurexin1 β -1-Nhe	JC1609	acgcgctagccccaggccac	sentido
pCMV-Ig neurexin1 β -1-Nhe	JC1610	gatgctagcgcgattcagatcctc	antisentido
pCMV-Ig neurexin1 β -1-Nhe	JC1611	gatagcgcgattcagatcctc	sentido
pCMV-Ig neurexin1 β -1-Nhe	JC1612	acgcgctgactcagttgctc	antisentido
pCMV-IgFlrt3	JC1615	tagcgcgctgctctgctccatctgtgtgctgc	sentido
pCMV-IgFlrt3	JC1616	cgacgtcgaccaaaggtaaattgggtttgtaagg	antisentido
pCMV-IgTen2	JC1613	tagcgcgctgacgcgattcagatcctc	sentido
pCMV-IgTen2	JC1614	cgacgtgactccatctcattctgtcttaaaaactg	antisentido
pCMV-Ten2-8xHis	JCOZ17030	tatagctagcgcgattacaaggatgacgacgataaa	sentido
pCMV-Ten2-8xHis	JCOZ17031	atatgtcgactcagtggtggtgatggtgatgatgtctagagctattcagatcctc	antisentido

4.2 Transfección celular con polietilenimina (PEI)

Las células HEK-293T fueron sembradas en cajas de Petri de 10 cm de diámetro con medio DMEM conteniendo 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM de glutamina, 0.1 mg/ml de penicilina y 10,000 U/ml de estreptomicina. Las células se transfectaron al alcanzar el 80-90% de confluencia. Se preparó el complejo PEI-DNA plasmídico en un tubo de policarbonato de 15 ml estéril, colocando 1.2 ml de DMEM, 20 µg de ADN plasmídico y 60 µl de PEI (1 mg/ml). Esta mezcla se incubó por 30 min a 22°C y se aforó a 5 ml con DMEM. Se retiró el medio y las células fueron lavadas con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) antes de agregar el complejo PEI-DNA plasmídico e incubar a 37°C por 30 min en la incubadora de CO₂. Posteriormente se agregaron 5 ml de DMEM conteniendo 20% de SFB y 4 mM de glutamina, incubando por 16 h antes de cambiar el medio por medio fresco y continuar la incubación para completar 48 h.

4.3 Método alternativo de la transfección celular con PEI

Las células HEK-293T se cultivaron como se describió antes y se transfectaron al alcanzar el 80-90% de confluencia. Se preparó el complejo PEI-DNA plasmídico en un tubo de policarbonato de 15 ml estéril, colocando 1.2 ml de DMEM, 18 µg de ADN plasmídico y 54 µl de PEI (1 mg/ml). La mezcla se incubó por 30 min a 22°C y se llevó a 5 ml con DMEM. Se retiró el medio y las células fueron lavadas con solución PBS antes de agregar el complejo PEI-DNA plasmídico e incubar a 37°C por 30 min en la incubadora de CO₂. Posteriormente se agregaron 5 ml de DMEM conteniendo 10% de SFB, incubando por 3 h antes de cambiar el medio por medio fresco y continuar la incubación para completar 96 h.

4.4 Transfección celular por el método de precipitación del fosfato de calcio

Las células HEK-293 se sembraron en cajas de Petri de 10 cm de diámetro con medio DMEM conteniendo 10% de SFB y antibióticos. Una vez alcanzado el 80-90% de confluencia, se cambió el medio de cultivo por 10 ml de DMEM/FBS (10%) conteniendo 25 mM de cloroquina y se incubó por 3 h en una incubadora de CO₂. En un tubo Eppendorf (A) se mezclaron 25 µg de ADN plasmídico, 62 µl de solución de CaCl₂ (2 M) y se aforó a 500 µl con H₂O. En otro tubo Eppendorf (B) se colocaron 500 µl de solución HBS (274 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 42 mM HEPES, y 11 mM D-glucosa; pH 7.05 con NaOH).

La mezcla del tubo A se transfirió al tubo B gota a gota mientras se agitaba suavemente con un vórtex. La mezcla resultante se añadió inmediatamente a las células gota a gota y de manera uniforme sobre toda la caja. Se incubó por 96 h a 37°C en la incubadora de CO₂, y cuando el medio se tornó amarillo (~48 h post-transfección) se neutralizó agregando 350 µl de una solución de HEPES (1 M, pH 7.9; concentración final 43 mM).

4.5 Producción y purificación de ligandos endógenos solubles

Para la expresión de ligandos etiquetados con la Fc-Ig G se utilizaron los métodos descritos en las referencias 21 y 22. Las células HEK-293T se sembraron en cajas de Petri de 10 cm de diámetro, y una vez que alcanzaron el 80-90% de confluencia se transfectaron con el método de fosfato de calcio o con el método alternativo con PEI.

El medio de cultivo, que contiene los ligandos solubles, fue recuperado 4 días después de la transfección en tubos de policarbonato de 50 ml y se centrifugó a 3,260xg durante 15 min para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se recuperó y se ajustó el pH a 7.4 con una solución de HEPES (10 mM, pH 7.4), se adicionó (dilución 1:100) una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Roche, número de catálogo 11 836 145 001; AEBSF 100 mM, aprotinina 80 µM, bestatina

5 mM, EDTA 1 mM, E-64 1.5 mM, leupeptina 2 mM) o PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 1 mM) y se incubó durante 24 h a 4°C con agitación suave en presencia de perlas de sefarosa unida a proteína A (100 µl, dilución 1:1 con PBS), que tiene alta afinidad por la Fc-IgG. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la mezcla se centrifugó a 3,260xg durante 5 min para separar del sobrenadante el complejo perlas de sefarosa/proteínas.

Las perlas se lavaron 3 veces con 1 ml de PBS (pH 7.4, 4°C). Se centrifugó a 3,260xg durante 5 min para eliminar las proteínas no unidas, y la pastilla obtenida se resuspendió en PBS (4°C). Para separar los ligandos de la proteína A unida a las perlas de sefarosa, la suspensión se colocó en columnas de centrifugación Pierce™ (Thermo Scientific™, número de catálogo 89868) y se centrifugó por 5 s a 3,920xg para retirar el PBS. Para eluir las proteínas, las perlas fueron resuspendidas en una solución HEPES (10 mM, pH 7.4; 3 veces el volumen de las perlas) conteniendo MgCl₂ (4 M) incubando por 8 min y centrifugando 5 s a 3,920xg (4°C). Este procedimiento se repitió 4 veces recuperando los productos eluidos, los cuales se colocaron en una columna del kit Amicon® Ultra-0.5 ml (Centrifugal Filter Devices; Sigma-Aldrich, número de catálogo 10019193) para proteínas con poro de 100 kDa, para ultrafiltración. Para eliminar el MgCl₂, al volumen remanente (~50 µl) se agregaron 350 µl de una solución amortiguadora (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4) y nuevamente se centrifugó para obtener el mismo volumen remanente; este procedimiento se realizó 6 veces. Se cuantificó la cantidad de proteína obtenida por electroforesis (80 V, 25 min; 120 V, 70 min) en un gel de poliacrilamida al 8% en el cual se cargaron cantidades conocidas de albúmina.

4.6 Ensayos de *Western blot*

A las 48 h de la transfección, las células HEK-293T se rasparon en solución de lisis (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 1% Tritón X-100, 10% desoxicolato de sodio, 2% SDS, 150 mM NaCl y un cóctel de inhibidores de proteasas). Las muestras se sonicaron y se centrifugaron, y el sobrenadante (30 µg de proteína) se

resolvió por SDS-PAGE (gel al 8%), para después transferir a una membrana de nitrocelulosa o PVDF (58).

Las membranas se bloquearon (1 h, 22°C) en una solución salina amortiguada con Tris que contenía BSA al 3% y Tween-20 (0.1% v:v; T-BST), antes de incubarlas durante la noche a 4°C en solución T-BST (3% de BSA) conteniendo los anticuerpos primarios (anti-HA, anti-Flag, anti-Myc, anti-ERK 1/2, o anti α -tubulina de ratón; dilución 1:1000). Después de enjuagar con T-BST, las membranas se incubaron durante 1 h a 22°C con un anticuerpo secundario generado en burro (IgG anti-ratón acoplado a IRDye 800 CW; 1:8000 en T-BST/3% de BSA) Las membranas fueron lavadas con T-BST, la fluorescencia se determinó con el equipo Odyssey® Fc Imaging, y se cuantificó por densitometría con el programa Image studio 5.2 (*Licor*). Las bandas de interés se expresaron cuantitativamente normalizándolas con base en la intensidad de la señal de la α -tubulina (control de carga).

4.7 Ensayos de la detección del receptor en la superficie celular (DESC)

Las células HEK-293T transfectadas con cada variante del receptor latrofilina-1 fueron sembradas en cajas de 96 pozos, 16 h después de la transfección, y se continuó la incubación en una atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Después de 48 h las células se lavaron una vez con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% frío durante 10 min sobre hielo. Se lavaron nuevamente con PBS frío y posteriormente se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min en una solución de bloqueo (3% de BSA en PBS) conteniendo 0.1 % de NaN₃. Transcurrido el tiempo, las células fueron lavadas dos veces con solución de bloqueo, antes de incubarlas con anticuerpos anti-Flag generado en conejo (Sigma-Aldrich, número de catálogo F7425; 1:1000 en solución de bloqueo) por 1 h a temperatura ambiente.

Las células se lavaron dos veces con solución de bloqueo y se incubaron (30 min, temperatura ambiente) con el anticuerpo secundario (anti-conejo generado en cabra; Sigma-Aldrich, número de catálogo 12-348; 1:32,000 en solución de bloqueo) acoplado a peroxidasa de rábano. Las células fueron lavadas dos veces con

solución de bloqueo y una vez con PBS antes de realizar el ensayo colorimétrico. Brevemente, se añadió 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (sustrato de la peroxidasa de rábano) a cada pozo y se incubó a temperatura ambiente durante ~10 min hasta la aparición de una coloración azul. La reacción se detuvo adicionando un volumen igual de H₂SO₄ (1 M), que produjo una coloración amarilla. La absorbancia se cuantificó a 450 nm con el lector de placas Multiskan Ascent 96/384 Plate Reader (Thermo Scientific).

4.8 Ensayo de marcaje de superficie celular

Los ensayos de marcaje de superficie celular se realizaron esencialmente como se describe en la referencia 21. Para el análisis de la unión de los ligandos endógenos fusionados a la Fc-IgG humana con la latrofilina-1, células HEK-293T transfectadas con la latrofilina-1 fueron incubadas en DMEM que contenía 40 mM de HEPES-NaOH (pH 7.4), 0.1% de BSA y 10 nM de FLRT3^{ECD} (FLRT3) o 300 nM de Nr1x1^{ECD} (neurexina-1 β), durante 16 h a 4°C. Las células se lavaron 3 veces con DMEM frío para eliminar el exceso de ligandos endógenos y se fijaron con paraformaldehído al 4% frío conteniendo 2% de sacarosa (10 min sobre hielo). Las células se lavaron tres veces con PBS frío y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min en una solución de bloqueo (BSA al 3% en PBS). Se añadieron anticuerpos anti-Flag de conejo (Sigma-Aldrich, número de catálogo F7425) incubando por 1 h antes de realizar tres lavados con solución de bloqueo.

Posteriormente, las células se incubaron en la solución de bloqueo (1 h a temperatura ambiente) con el anticuerpo fluorescente Alexa anti-humano (AlexaFluor-488, emisión verde) para marcar los ligandos fusionados a la Fc de la IgG humana unidos a la superficie celular y el anticuerpo fluorescente Alexa anti-conejo (AlexaFluor-633, emisión roja) para marcar la latrofilina-1-Flag expresada en la membrana y unida al anticuerpo anti-Flag. Enseguida, las células se lavaron una vez con solución de bloqueo antes de ser incubadas por 5 min en solución PBS conteniendo 0.01 mg de DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol, tinción

nuclear; ThermoFisher Scientific, número de catálogo D1306). Finalmente, las células fueron lavadas dos veces con solución PBS y una vez con agua antes de montarlas en portaobjetos usando medio de montaje. Las muestras se analizaron mediante microscopía confocal (microscopio Leica SP8), y las imágenes se adquirieron con los mismos ajustes de adquisición para todas las muestras de un experimento (objetivo de inmersión 63X, aumento digital 3.5X) empleando la imagen de proyección máxima.

4.9 Ensayos de saturación de la unión de ligando

Se realizaron como se describe en las referencias 21 y 22. Brevemente, después de la transfección las células HEK-293T se incubaron en DMEM conteniendo 50 mM de HEPES (pH 7.4), 2 mM de CaCl_2 , 2 mM de MgCl_2 , 0.01% de BSA, y la concentración indicada de ligandos con Ig Fc por 16 h a 4°C. Las células se lavaron una vez con DMEM frío para eliminar el ligando no unido y se fijaron con paraformaldehído al 4% frío durante 10 min sobre hielo. Se lavaron nuevamente con PBS frío y posteriormente se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min en una solución de bloqueo (3% de BSA y 0.1 % de NaN_3 en PBS). Se adicionó un anticuerpo policlonal anti-IgG Fc humano de cabra acoplado a peroxidasa de rábano (dilución 1:40,000 en solución de bloqueo; MP Biomedicals, número de catálogo 0855226) y se continuó la incubación durante 1 h. Las células se lavaron tres veces con solución de bloqueo y una vez con PBS antes de realizar el ensayo colorimétrico de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Brevemente, se añadió 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (sustrato de la peroxidasa de rábano) a cada pozo y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min hasta la aparición de una coloración azul. La reacción se detuvo adicionando un volumen igual de H_2SO_4 (1 M), que produjo una coloración amarilla, y la absorbancia se cuantificó a 450 nm con el lector de placas Multiskan Ascent 96/384 Plate Reader (Thermo Scientific). La unión máxima y la unión mínima fueron determinadas como la absorbancia obtenida de célula transfectadas con el receptor y de células

transfectadas con el vector vacío, respectivamente, y la unión específica al sustraer la unión mínima de la unión máxima (Bmax). La constante de disociación (Kd) y la Bmax fueron determinadas ajustando la unión específica por regresión no lineal a la ecuación:

$$Y = B_{max} * X / (K_d + X)$$

donde Kd es la constante de unión de equilibrio, X es la concentración del ligando, y Bmax es la unión específica máxima.

4.10 Anticuerpos utilizados

El anticuerpo monoclonal de ratón anti-hemaglutinina (HA) fue adquirido de BioLegend (Clon 16B12, número de catálogo 901513). El anticuerpo policlonal anti-Flag de conejo fue de Sigma-Aldrich (número de catálogo F7425). El anticuerpo secundario anti-ratón Alexa-Fluor 633 y el anticuerpo secundario anti-humano Alexa-Fluor 488 fueron de Invitrogen (números de catálogo A21052 y A11013, respectivamente). El anticuerpo monoclonal de ratón anti-ERK1/2 y el anticuerpo policlonal de conejo anti-fosfo ERK-1/2 fueron de Cell Signaling (números de catálogo 4696 y 9101, respectivamente). El anticuerpo anti-ratón de burro acoplado a IRDye800CW y el anticuerpo anti-conejo de cabra acoplado a IRDye680RD fueron de Licor (números de catálogo 926-32212 y 926-68021, respectivamente). Los anticuerpos monoclonales de ratón anti- α -tubulina (clon 12G10) y anti-Myc (clon 9E10) fueron obtenidos del Banco de Hibridoma de Estudios de Desarrollo. El anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG Fc humano fue de MP Biomedicals (número de catálogo 0855226).

4.11 Ensayo de formación de AMPc

El ensayo se basa en la competencia entre [³H]-AMPc y el AMPc presente en las muestras biológicas por la unión a la subunidad reguladora de la PKA (58, 59). Las

células HEK-293T fueron sembradas en cajas de 24 pozos en presencia de DMEM conteniendo 10% de SFB, 2 mM de glutamina, 0.1 mg/ml de penicilina y 10,000 U/ml de estreptomicina, y se transfectaron 24 h después con el receptor (latrofilina-1) utilizando PEI. A las 48 h post-transfección el medio fue cambiado por 240 μ l de solución Krebs-Ringer-Hepes (KRH, en mM: HEPES 20, NaCl 113, NaHCO₃ 25, D-glucosa 15, KCl 4.7, CaCl₂ 1.8, MgCl₂, KH₂PO₄ 1.2) conteniendo 1 mM de IBMX (isobutil-metil-xantina, inhibidor de fosfodiesterasas; Sigma-Aldrich, número de catálogo I7018) para incubar 10 min a 37°C.

Se establecieron 3 condiciones: basal (KRH), forskolina (FSK, control positivo; Sigma-Aldrich, número de catálogo F3917) y ligando (Nrxn-1 β ^{ECD} o FLRT3^{ECD}). Después de 10 min de incubación a 37°C, a la condición control positivo se adicionaron 10 μ l de una solución de FSK (10 μ M como concentración final), a la condición estimulada se le agregaron 10 μ l de una solución del ligando correspondiente (Nrxn-1 β ^{ECD}, 300 nM, o FLRT3^{ECD}, 10 nM; concentraciones finales) y a la condición basal 10 μ l de KRH, para un volumen final de 250 μ l. Se incubó por 30 min a 37°C, se aspiró la solución y se agregaron 250 μ l de HCl (0.1 M, 4°C) incubando por 20 min sobre hielo. La reacción se neutralizó con 25 μ l de NaOH (1 M, 4°C) y 100 μ l de solución Tris-HCl (1 M, pH 7.0). El volumen total se recuperó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml para centrifugar a 15,000xg por 3 min a 4°C.

En un tubo de poliestireno de 3 ml se colocaron 50 μ l del sobrenadante de la muestra, 25 μ l de un extracto de la médula suprarrenal bovina (60) en solución de incubación (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 5 mM, pH 7.0) y 50 μ l de [³H]-AMPc (PerkinElmer, número de catálogo NET27500) para una concentración final de 10 nM. Después de 2.5 h de incubación a 4°C la solución fue filtrada a través de papel de fibra de vidrio (Whatman, número de catálogo 1821-914) previamente empapado (2 h) con una solución de PEI de cadena ramificada al 0.3% (Sigma-Aldrich, número de catálogo P3143), utilizando un colector automático Brandel. Los filtros se lavaron tres veces con agua a 4°C y se transfirieron a viales de plástico para cuantificar por centellometría la radioactividad retenida (contador

de centelleo líquido Beckman LS6000). La formación de AMPc se expresó como pmol de AMPc por pozo con base en una curva estándar.

4.11.1 Ensayo de inhibición de la acumulación de AMPc inducida por forskolina

Para los ensayos de la inhibición de la formación de AMPc inducida por FSK, se realizó el mismo procedimiento descrito, pero las células HEK-293T transfectadas con cada variante del receptor latrofilina-1 fueron incubadas bajo 3 condiciones: a) basal (sin ligandos); b) FSK; y c) FSK en presencia del ligando (Nrxn-1 β ^{ECD} o FLRT3^{ECD}) en dos adiciones. En el primer paso se adicionaron 10 μ l de KRH a las condiciones basal y FSK, mientras que a la condición ligando/FSK se le adicionaron 10 μ l de la solución del ligando correspondiente a la respectiva concentración, incubando por 15 min. En el segundo paso, a la condición basal se agregaron 10 μ l de KRH, mientras que a las condiciones FSK y ligando/FSK se les agregaron 10 μ l de FSK (10 μ M como concentración final).

4.12 Determinación de la concentración intracelular de Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) en células HEK-293T en suspensión

Las células HEK-293T se sembraron en placas Petri de 10 cm de diámetro y fueron transfectadas con cada variante SSB de la latrofilina-1 como se describió anteriormente. Después de 48 h, las células se despegaron con PBS que contenía EGTA (1 mM), se colectaron, se centrifugaron (800xg, 3 min), y la pastilla celular se resuspendió en una solución KRH modificada (en mM: 121 NaCl, 5.4 KCl, 0.8 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 25 HEPES, 6 NaHCO₃ y 5.5 D-glucosa; pH 7.3 con NaOH). Posteriormente, las células se incubaron con 1 μ M de Fura-2/AM (Molecular Probes, Life Technologies, número de catálogo ab120873) durante 2 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de lavar dos veces por centrifugación y resuspensión en solución KRH, se prepararon alícuotas (10⁶ células) en un volumen total de 2 ml de la misma solución amortiguadora las cuales fueron transferidas a

una cubeta de cuarzo. La cubeta fue colocada en la celda de un espectrofotómetro de fluorescencia (Espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-50B; lámpara de arco de xenón; PTI) con agitación continua de la suspensión celular.

Los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ se registraron como se describe en la referencia 59. Brevemente, las señales de Fura-2 se obtuvieron por excitación alterna (2.7 Hz a 100 ms de tiempo de integración) a longitudes de onda (λ) de 340, 360 y 380 nm, determinando la emisión a 515 nm. Las señales grabadas se promediaron, después de la sustracción del fondo, con una ventana de 7 puntos usando el algoritmo de Savitzky Golay del programa de análisis FeliX32 (PTI), y se transformaron a valores de $[Ca^{2+}]_i$ usando la ecuación de Grynkiewicz (61):

$$[Ca^{2+}]_i = K_d * \beta (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$$

donde K_d es la constante de disociación aparente de Fura-2 por Ca^{2+} (200 nM), y R es la relación de fluorescencia a 340 nm/380 nm, después de sustraer la lectura de fondo y aplicar la corrección de la viscosidad como fue descrito por Poenie (74). La relación de fluorescencia máxima (R_{max}) se obtuvo permeabilizando las células con digitonina (10 μ M), y la fluorescencia mínima (R_{min}) se determinó en presencia de EGTA. El fondo de fluorescencia de la suspensión celular se determinó mediante la adición de Mn^{2+} .

4.13 Ensayos de fosforilación de MAP cinasas (MAPKs)

Las células HEK-293T transfectadas con cada variante del receptor latrofilina-1 se levantaron y se sembraron en placas de 48 pozos 24 h post-transfección (58). Después de 8 h, el medio se substituyó por DMEM conteniendo 0.5% de BSA y 2 mM de glutamina, y se continuó con la incubación en una atmosfera de 5% de O_2 y 95% de CO_2 a 37°C. A las 48 h post-transfección se retiró el medio y se realizó un lavado con solución KRH a 37°C antes de realizar la estimulación con 300 nM de $Nrxn-1\beta^{ECD}$ incubando en la misma solución a 37°C. La estimulación se detuvo

colocando las placas en agua-hielo y agregando 300 µl de solución KRH fría a cada pozo.

Se retiró la solución y las células se solubilizaron mediante sonicación en solución amortiguadora de carga (50 mM Tris-HCl, 100 mM ditioneitol, 2% de SDS, 10% de glicerol, 0.1% de azul de bromofenol; pH 6.8). Las muestras fueron cargadas en gel SDS-PAGE al 10% para separar las proteínas que fueron posteriormente transferidas a una membrana de PVDF (polidivilino de fluoruro).

Las membranas se bloquearon (1 h, 22 °C) en una solución salina amortiguada con Tris que contenía BSA al 3% y Tween-20 (0.1% v:v; T-BST), antes de incubarlas durante la noche a 4°C en solución T-BST con 3% de BSA conteniendo el anticuerpo primario de ratón anti-ERK1/2 y el anticuerpo primario de conejo anti-fosfo ERK-1/2 (dilución 1:1000, marca: Cell Signaling, números de catálogo: 4696 y 9101, respectivamente). Después de enjuagar con T-BST, las membranas se incubaron con protección de la luz durante 1 h a 22°C con un anticuerpo secundario generado en burro (IgG anti-ratón acoplado a IRDye 800 CW; Licor, número de catálogo 926-32212) y un anticuerpo anti-conejo de cabra acoplado a IRDye680RD (dilución: 1:8000; Licor, número de catálogo 926-68021) en T-BST con 3% de BSA. Las membranas fueron lavadas con T-BST nuevamente, la fluorescencia se determinó con el equipo Odyssey® Fc Imaging y se cuantificó por densitometría con el programa Image studio 5.2 (Licor). Las bandas de interés se expresaron cuantitativamente normalizándolas con base en la intensidad de la señal del control (no estimulado).

4.14 Análisis del alineamiento de las secuencias

Para el análisis de secuencias se realizó un alineamiento múltiple usando la herramienta bioinformática Clustal Omega en la configuración MAFFT (*Multialignment using Fast Fourier Transform*) del sitio web EMBL-EBI (www.ebi.ac.uk). Las secuencias fueron obtenidas de la base de datos NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), así como de la base de datos Ensembl (www.ensembl.org).

Los números de referencia de las secuencias son:

Rattus norvegicus [NC_005118.4 and ENSRNOG00000029134],

Mus musculus [NC_000074.6 and ENSMUSG00000013033],

Macaca mulatta [NC_027911.1 and ENSMMUG00000014137],

Canis lupus familiaris [NC_006602.3 and ENSCAFG00000016453],

Homo sapiens [NC_000019.10 and ENSG00000072071],

Pan troglodytes [NC_036898.1 and ENSPTRG00000010588],

Bos taurus [NC_037334.1 and ENSBTAG00000003675],

Equus caballus [NC_009150.3 and ENSECAG00000021555].

Las versiones de los ensamblajes de los genomas utilizados para el análisis fueron:

Rattus norvegicus (Rnor_6.0), *Mus musculus* (GRCm38.p6), *Macaca mulatta* (Mmul_10), *Canis lupus familiaris* (CanFam3.1), *Homo sapiens* (GRCh37.p13), *Pan troglodytes* (Clint_PTRv2), *Bos taurus* (ARS-UCD1.2); *Equus caballus* (EquCab3.0).

5. Resultados

5.1 Generación de los vectores de expresión

A partir de plásmidos disponibles, se generaron las construcciones plasmídicas que codifican los ligandos endógenos solubles del receptor latrofilina-1. La región extracelular de FLRT3 y teneurina-2 se fusionó a la Fc de la IgG humana y los amplicones (1,637 y 7,229 pb, respectivamente) correspondientes a la región soluble de estas proteínas se obtuvieron por PCR de punto final (Figura 13). Estos amplicones fueron insertados en el plásmido pCMV Ig-neurexina-1 β -NheI (vector), utilizando las enzimas NheI y Sall, con las que se realizaron los mismos cortes en el vector, y la ligación se realizó con la T4 ADN ligasa. Para corroborar la obtención de las construcciones plasmídicas correctas, éstas se sometieron a análisis de restricción con endonucleasas (XhoI y EcoRI) obteniendo el patrón de bandas esperado, y posteriormente fueron secuenciadas.

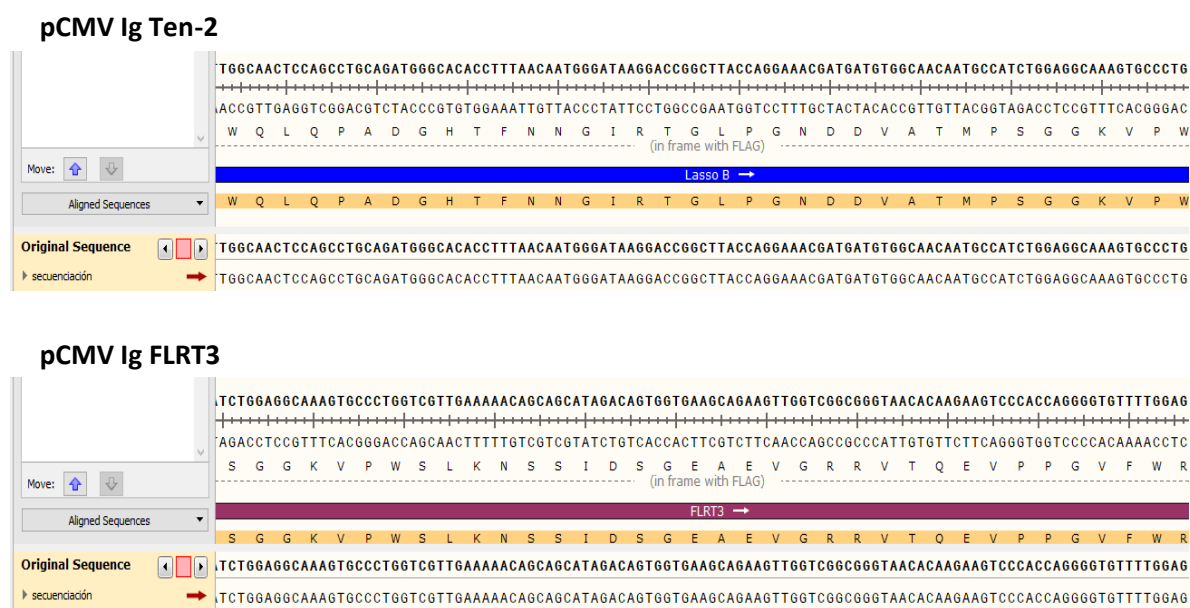


Figura 13. Secuenciación de los plásmidos generados. El electroferograma muestra la secuenciación de los nuevos plásmidos, la cual confirmó la identidad.

5.2 Obtención de los ligandos endógenos solubles del receptor latrofilina-1

Las células HEK-293 fueron transfectadas con cada uno de los plásmidos que codifican los ligandos endógenos solubles, posteriormente se evaluó la expresión de las proteínas recombinantes fusionados a la Fc de la IgG humana (Nrnx-1 β ^{ECD}, FLRT3^{ECD} y Ten-2^{ECD}), y en paralelo se evaluaron dos métodos de transfección (precipitación por fosfato de calcio y polietilenimina, PEI) para optimizar la producción de estas proteínas.

Las células HEK-293 expresaron las proteínas evaluadas; sin embargo, la expresión fue mayor cuando fueron transfectadas con el método de precipitación por fosfato de calcio (Figura 14).

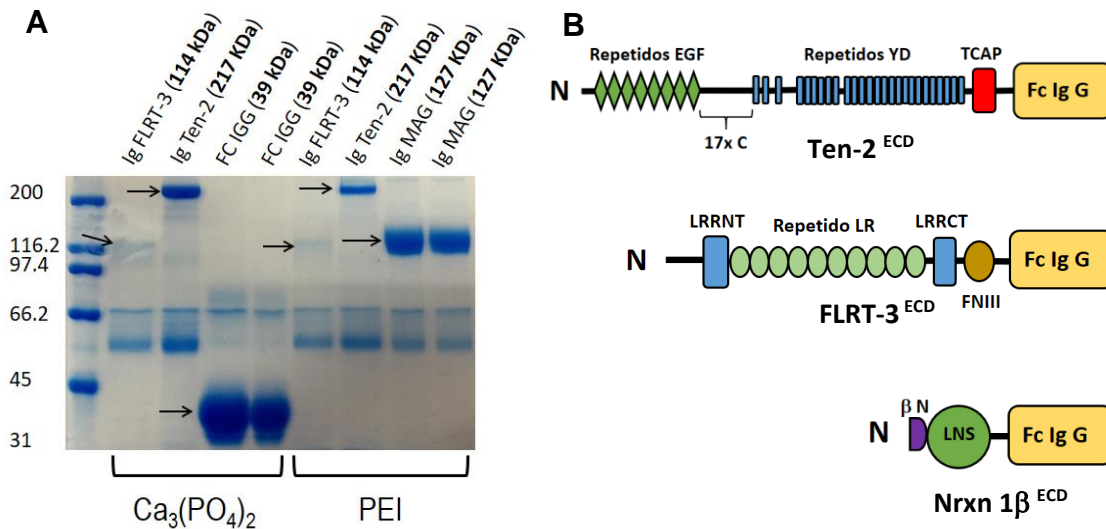


Figura 14. Expresión de los ligandos endógenos solubles de la latrofilina-1 por células HEK-293 transfectadas por los métodos de precipitación por fosfato de calcio y PEI. **A.** Análisis de la expresión en células transfectadas con los ligandos teneurina-2^{ECD} (217 kDa) y FLRT3^{ECD} (114 kDa). Como control de transfección se utilizaron las proteínas MAG^{ECD} (127 kDa) y Fc-Ig C^{ECD} (39 kDa). Las flechas indican las bandas que corresponden a las proteínas de interés. **B.** Esquema de la arquitectura estructural de los ligandos solubles endógenos fusionados a la Fc de la IgG humana.

Para corroborar que las bandas obtenidas correspondían a los ligandos endógenos solubles de la latrofilina-1, se realizaron ensayos de inmunodetección utilizando un anticuerpo que reconoce la Fc de la Ig G humana y que se encuentra acoplado a la peroxidasa de rábano (HRP). Los resultados mostraron que las bandas observadas en el gel teñido con azul de *Coomassie* corresponden a los ligandos solubles sintéticos (Figura 15). Con base en estos resultados se realizó la producción de los ligandos a mayor escala obteniéndose cantidades cuantificables y suficientes para la realización de los ensayos funcionales.

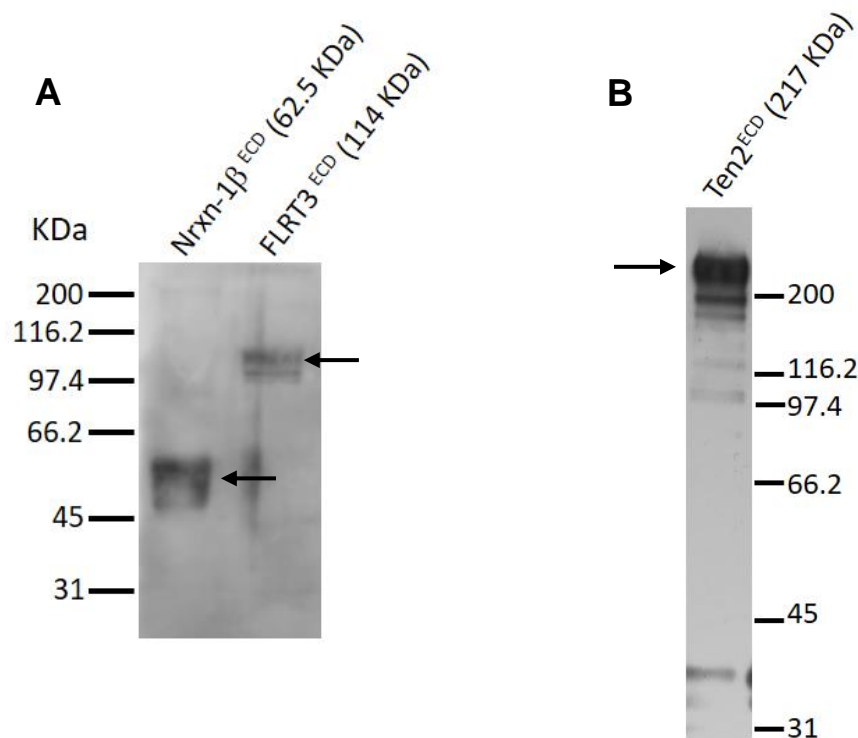


Figura 15. Expresión de los ligandos solubles sintéticos por las células HEK-293. **A.** Carril 1: Nr1x1-1 β ^{ECD} (pCMV-Ig neurexin1 β); carril 2: FLRT3^{ECD} (pCMV-IgFlrt3); **B.** Ten-2^{ECD} (pCMV-IgTen2). Las flechas señalan las bandas que corresponden a los ligandos sintéticos. En ambos gels se utilizó un anticuerpo anti-IgG Fc humana acoplado a peroxidasa de rábano.

5.3 Efecto del sitio de procesamiento alternativo B (SSB) en la expresión de la latrofilina-1

Para evaluar el efecto del inserto de 45 aa producto del procesamiento alternativo B (SSB) en la expresión del receptor latrofilina-1, las células HEK-293T fueron transfectadas con las variantes Lphn-1^{-SSB} o Lphn-1^{+SSB} (Figura 16). La primera variante carece de los insertos en el SSA (5 aa) y SSB (45 aa), mientras que la segunda variante carece del inserto en el SSA pero incluye el SSB. Ambas están marcadas con la bandera de hemaglutinina (HA) en la primera asa extracelular y con la bandera Flag en el dominio amino terminal.

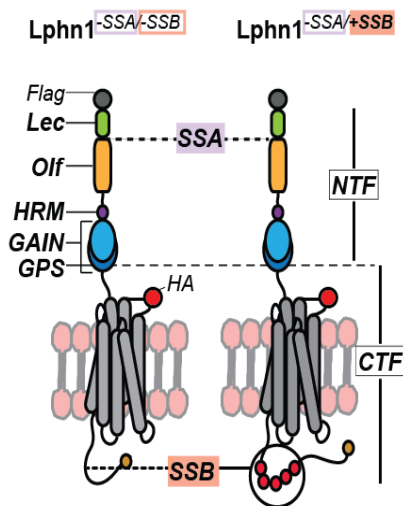


Figura 16. Representación esquemática de las variantes Lphn-1^{-SSB} y Lphn-1^{+SSB} del receptor latrofilina-1. Se muestra la posición de las banderas, Flag en el dominio amino terminal y la bandera de hemaglutinina (HA) en la primera asa extracelular del receptor. Se indican también los dominios: lectina (Lec), olfatomedina (Olf), unión a hormonas (HRM), dominio de auto-proteólisis del GPCR (GAIN), sitio de proteólisis GPCR (GPS), fragmentos N terminal (NTF) y C terminal (CTF). Los sitios de empalme SSA y SSB se expresan con los símbolos + y -, indicando la presencia o ausencia de inserto, respectivamente.

Mediante la técnica de *Western blot* (Figura 17) con un anticuerpo anti-HA, se detectaron para la variante Lphn-1^{-SSB} bandas de ~189 kDa y ~70 kDa (peso molecular aparente), y para la variante Lphn-1^{+SSB} bandas de ~193 kDa y ~74 kDa. En el control negativo, células transfectadas con el vector vacío, no se observaron bandas. Las bandas de menor peso molecular corresponden al CTF y las bandas de mayor peso molecular corresponden al receptor de tamaño completo, el cual no experimentó el corte auto-proteolítico en el sitio GPS. La expresión fue cuantificada y se normalizó como porcentaje del control correspondiente (Lphn-1^{-SSB}) en cada

conjunto de experimentos. Para la fracción no cortada, la expresión de la variante Lphn-1^{-SSB} correspondió a $39.5 \pm 8.5\%$ del valor control, mientras que para la variante Lphn-1^{+SSB} fue $38.6 \pm 6.6\%$, sin diferencia significativa de acuerdo al análisis estadístico. En la fracción cortada (CTF), la expresión de la variante Lphn-1^{-SSB} correspondió a $60.5 \pm 8.5\%$, mientras que para la variante Lphn-1^{+SSB} fue $72.6 \pm 12.5\%$, también sin diferencia significativa.

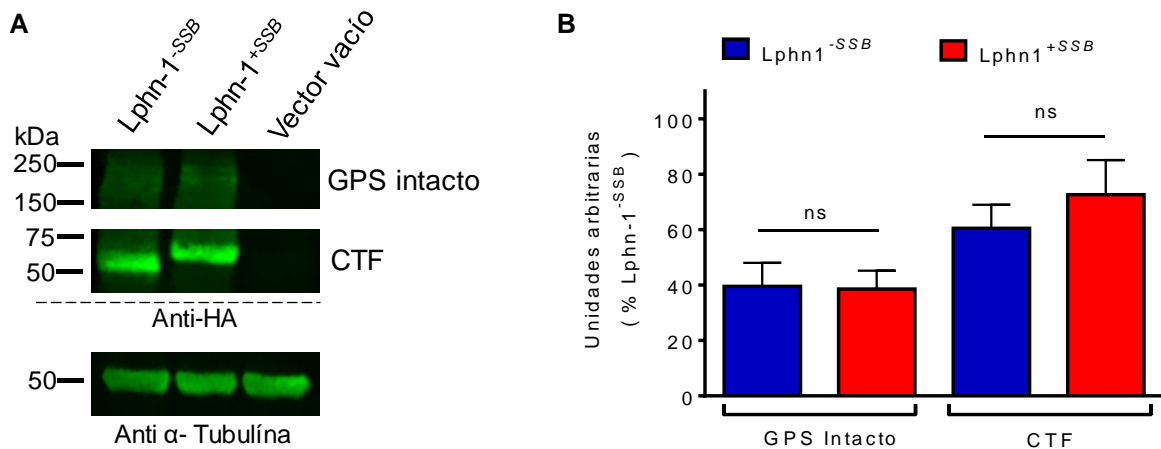


Figura 17. Efecto del SSB en la expresión de la latrofilina-1 en extractos totales de células HEK-293T transfectadas. La expresión fue detectada con un anticuerpo anti-HA. **A.** *Western blot* que muestra la expresión de las variantes de la latrofilina-1; las bandas de ~189 y ~193 kDa corresponde al receptor de tamaño completo, y las bandas de ~70 y ~74 kDa corresponden al fragmento CTF. **B.** Cuantificación de la expresión de ambas variantes de la latrofilina-1. Los valores se expresan como unidades arbitrarias de fluorescencia y corresponden al promedio \pm el error estándar (SEM) de 4 experimentos. *ns*, no estadísticamente significativo. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student.

La expresión del fragmento N terminal no pudo ser detectada mediante el anticuerpo anti-HA, dada la localización del epitopo en la tercera asa extracelular del receptor, por lo que se evaluó la expresión de ambas variantes con un anticuerpo anti-Flag (bandera Flag en el dominio N terminal; Figura 18). Para la variante Lphn-1^{-SSB} se detectaron bandas de ~189 y ~120 kDa, y para la variante Lphn-1^{+SSB} de ~193 y

~120 kDa. En el control negativo, células transfectadas con el vector vacío, no se observaron bandas. Las bandas de menor peso molecular corresponden al NTF y las bandas de mayor peso molecular corresponden al receptor de tamaño completo, el cual no sufrió el corte auto-proteolítico.

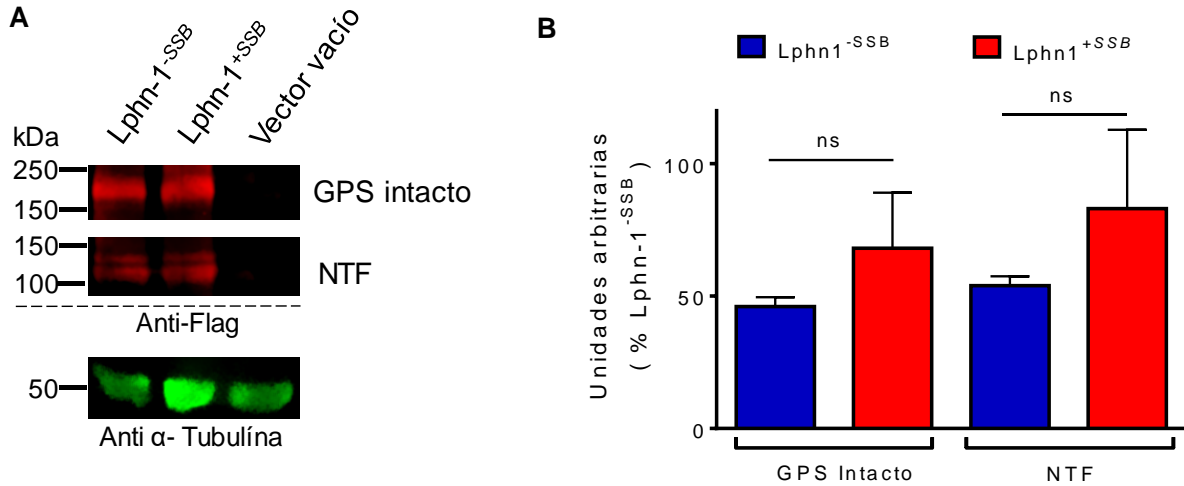


Figura 18. Efecto del SSB en la expresión de la latrofilina-1 en extractos totales de células HEK-293T transfectadas. La expresión fue detectada con un anticuerpo anti-Flag. **A.** *Western blot* que muestra la expresión de las variantes de latrofilina-1; las bandas de ~189 y ~193 kDa corresponden al receptor de tamaño completo y las dos bandas de ~120 kDa corresponden al fragmento NTF. El fragmento CTF no se detectó por la posición de la bandera Flag. **B.** Cuantificación de la expresión de ambas variantes de la latrofilina-1. Los valores se expresan como unidades arbitrarias de fluorescencia y corresponden al promedio \pm SEM de 3 experimentos. *ns*, no estadísticamente significativo, prueba *t* de Student.

La expresión fue cuantificada y fue normalizada como porcentaje del control (Lphn-1^{-SSB}). Para la fracción no escindida, la expresión de la variante Lphn-1^{-SSB} correspondió a $46.0 \pm 3.5\%$ del valor control, mientras que para la variante Lphn-1^{+SSB} fue $68.1 \pm 21.0\%$, sin diferencia estadísticamente significativa. En la fracción cortada (NTF), la expresión de la variante Lphn-1^{-SSB} correspondió a $54.0 \pm 3.5\%$, mientras que para la variante Lphn-1^{+SSB} fue $83.0 \pm 30.0\%$, sin diferencia significativa.

A pesar que no se observaron diferencias en la expresión de ambas variantes cuando se utilizaron extractos de proteínas totales, se evaluó también si el inserto en el SSB afectaba la expresión del receptor en la superficie celular (Figura 19), ya que la cantidad similar de proteínas totales no aseguraba un número igual de receptores en la superficie celular, lo que podría reflejarse en cambios en la señalización intracelular. Las células HEK-293T fueron transfectadas con cada variante de la latrofilina-1 y la expresión del receptor fue evaluada por DESC, que permite determinar la expresión del mismo en la superficie celular. Las células que expresan cada variante de la latrofilina-1 fueron fijadas con paraformaldehído en condiciones no permeabilizantes, por lo que el anticuerpo anti-Flag solo detecta los receptores presentes en la superficie celular al no poder ingresar al interior de la célula. La cuantificación indicó una similar expresión de ambas variantes, indicando que la presencia o ausencia del SSB no afecta la expresión del receptor latrofilina-1 en la superficie celular.

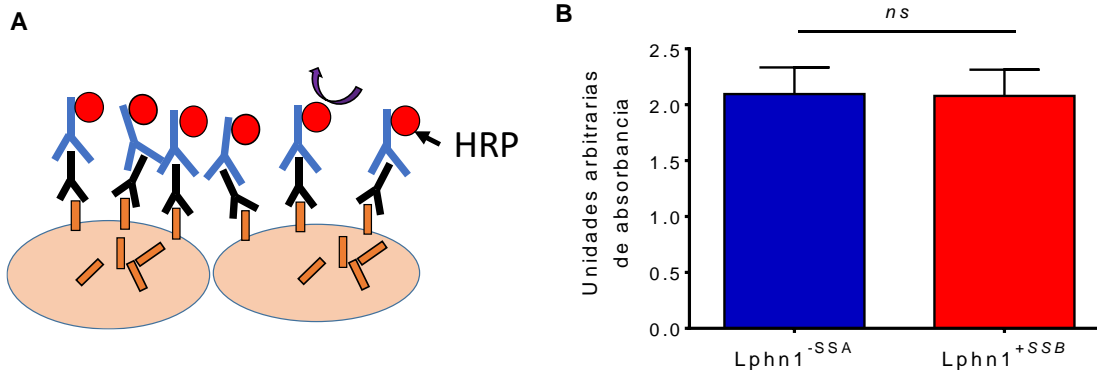


Figura 19. Efecto del SSB en la expresión en la superficie celular de la latrofilina-1 en células HEK-293T transfectadas. A. Representación esquemática del ensayo de detección de la expresión en la superficie celular. El anticuerpo anti-Flag se indica en negro, y el anticuerpo acoplado a HRP en azul. **B.** Cuantificación de la expresión en la superficie celular de ambas variantes de la latrofilina-1. Los valores se expresan como unidades arbitrarias de absorbancia y corresponden al promedio \pm SEM de 3 experimentos. *ns*, no estadísticamente significativo, prueba *t* de Student.

5.4 Interacción de los ligandos endógenos solubles con el receptor latrofilina-1

5.4.1 Marcaje de superficie celular

Para evaluar la unión de los ligandos solubles sintéticos a la latrofilina-1 se generaron proteínas recombinantes que contenían la región extracelular de la neurexina-1 β (Nrxn-1 β^{ECD}) y FLRT3 (FLRT3 ECD) fusionadas a la Fc-IgG humana. En el ensayo de unión a la superficie celular (21), las células HEK-293T que expresaban Lphn-1 $^{-SSB}$ o Lphn-1 $^{+SSB}$ (magenta) se incubaron con Nrxn-1 β^{ECD} (300 nM) o FLRT3 ECD (10 nM) (Figuras 20 y 21).

Se observó una marcada unión de Nrxn-1 β^{ECD} y de FLRT3 ECD (verde) en las células que expresan cada variante. Como control negativo se utilizó a la Fc de la IgG humana que no contiene el ligando fusionado, por lo que no se detectó señal alguna.

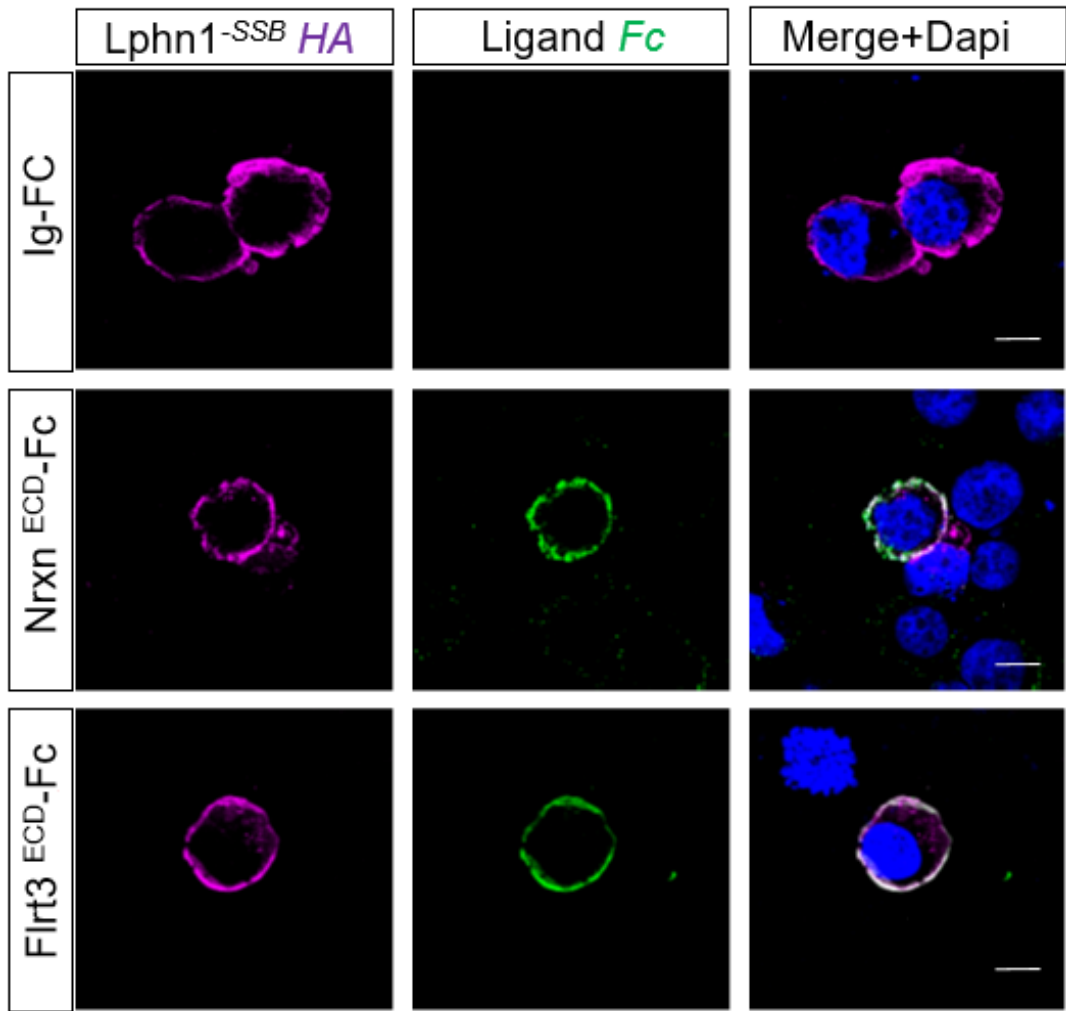


Figura 20. El marcaje de superficie celular muestra la interacción específica de los ligandos endógenos con la variante Lphn-1^{SSB}. Las células HEK-293T transfectadas con la variante Lphn-1^{SSB} fueron incubadas con los ligandos fusionados a la Fc de la Ig G humana, y como control negativo se utilizó la Fc de la Ig G humana (Ig C). Imágenes representativas de 3 experimentos.

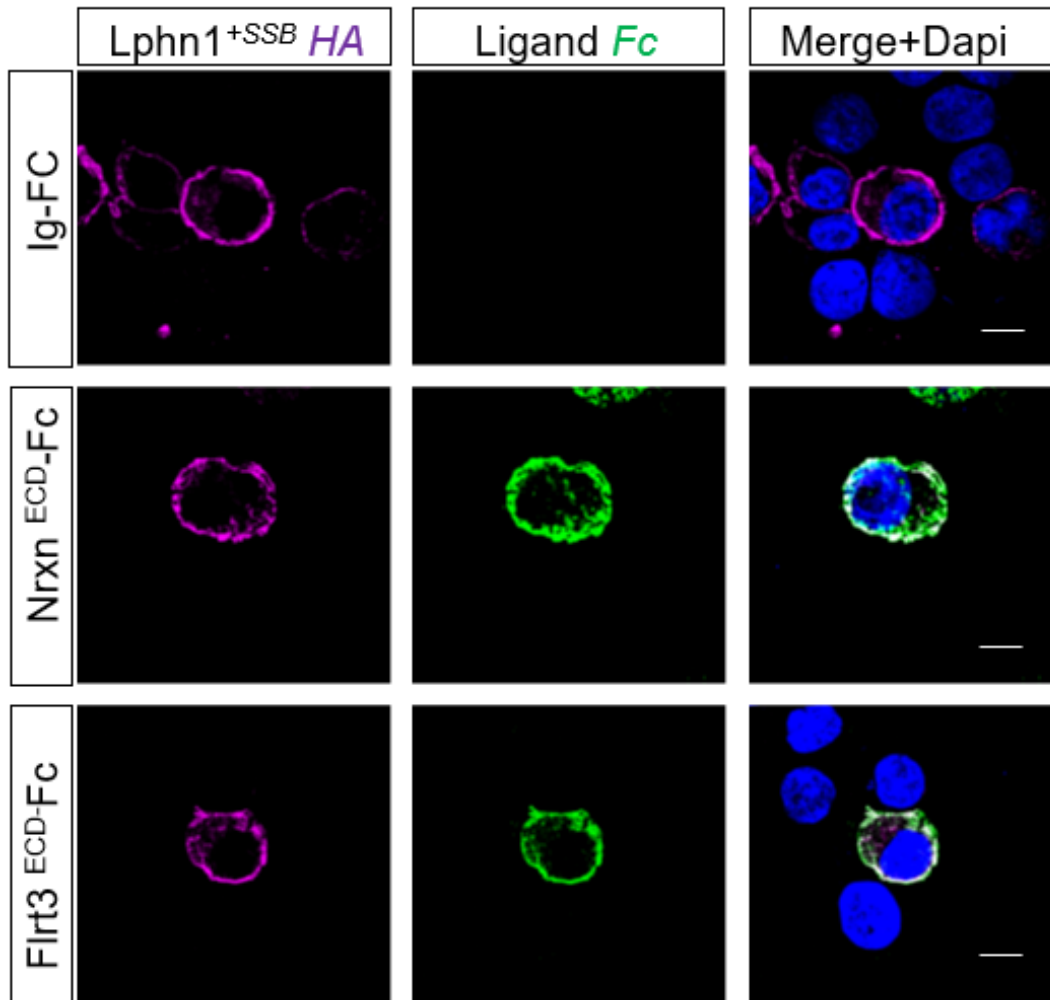


Figura 21. El marcaje de superficie celular muestra la interacción específica de los ligandos endógenos solubles con la variante Lphn-1^{+SSB}. Las células HEK-293T transfectadas con la variante Lphn-1^{+SSB} fueron incubadas con los ligandos fusionados a la Fc de la Ig G humana, y como control negativo se utilizó la Fc de la Ig G humana (Ig C). Imágenes representativas de 3 experimentos.

Se evaluó también la interacción del ligando endógeno soluble Ten2^{ECD} (teneurina-2 fusionada Fc de la Ig humana; 10 nM) con la variante Lphn-1^{-SSB}; sin embargo, no se observó la señal verde (Figura 22), lo que indica que esta proteína recombinante no se une al receptor.

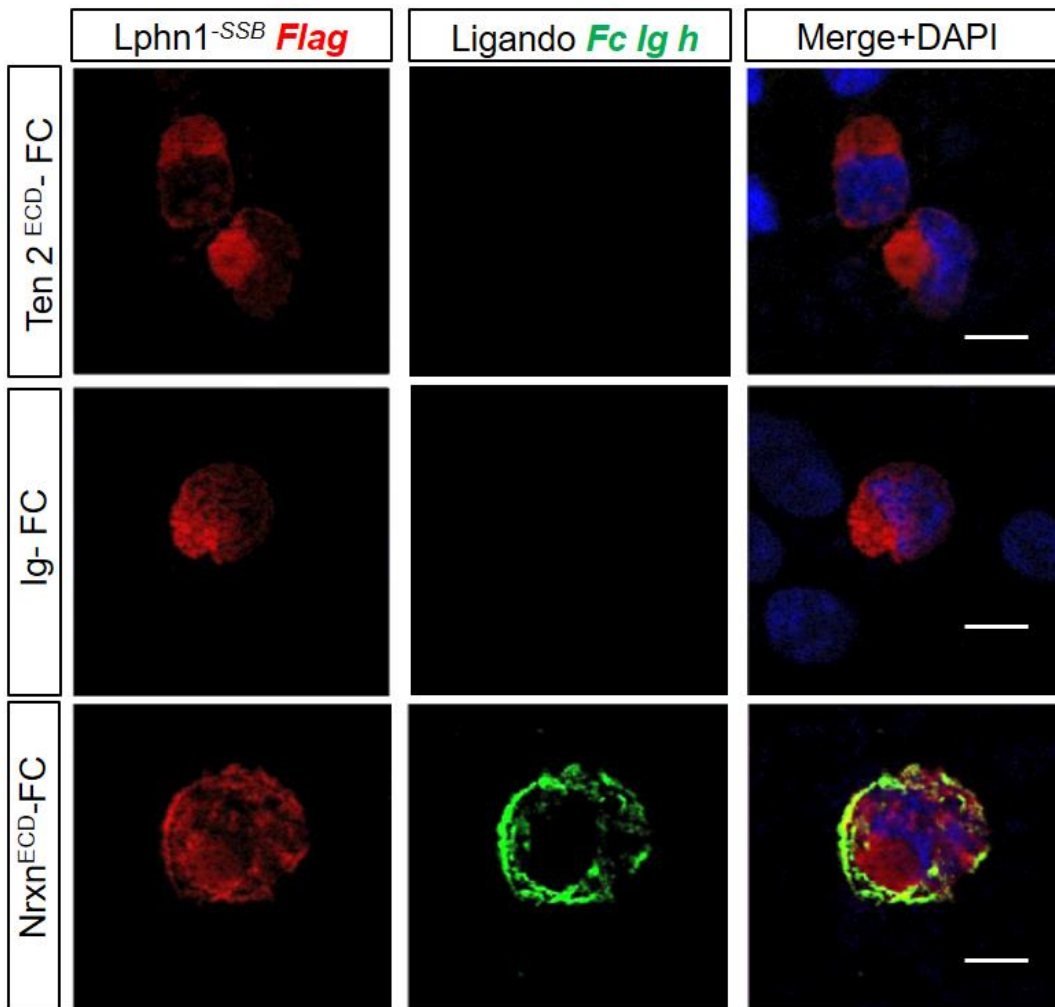


Figura 22. El marcaje de superficie celular muestra que el ligando endógeno soluble Ten2^{ECD} no se une a la variante Lphn-1^{-SSB}. Las células HEK-293T transfectadas con la variante Lphn-1^{-SSB} fueron incubadas con Ten2^{ECD}; como control positivo se utilizó Nrxn^{ECD}-FC y como control negativo la Fc de la Ig G humana (Ig C). Imágenes representativas de 3 experimentos.

Dado que el ligando endógeno soluble Ten2^{ECD} no se unió al receptor latrofilina-1, se diseñó un plásmido que codificara una proteína recombinante diferente a la anterior, la cual contenía la parte amino terminal una bandera Flag, seguida de la región extracelular de la teneurina-2 fusionada a dos banderas de Myc y 8 residuos de Histidina en la región carboxilo terminal. Los residuos de Histidina se insertaron para purificar el ligando endógeno soluble (Figura 23B). La construcción plasmídica fue transfectada en células HEK-293 y la inmunodetección se realizó con ensayos de *Western blot* utilizando un anticuerpo anti-Myc (DSHB; número de catálogo 9E10-s) en un extracto de proteínas totales. Los resultados indicaron que la nueva proteína recombinante fue expresada por las células HEK-293 (Figura 23A).

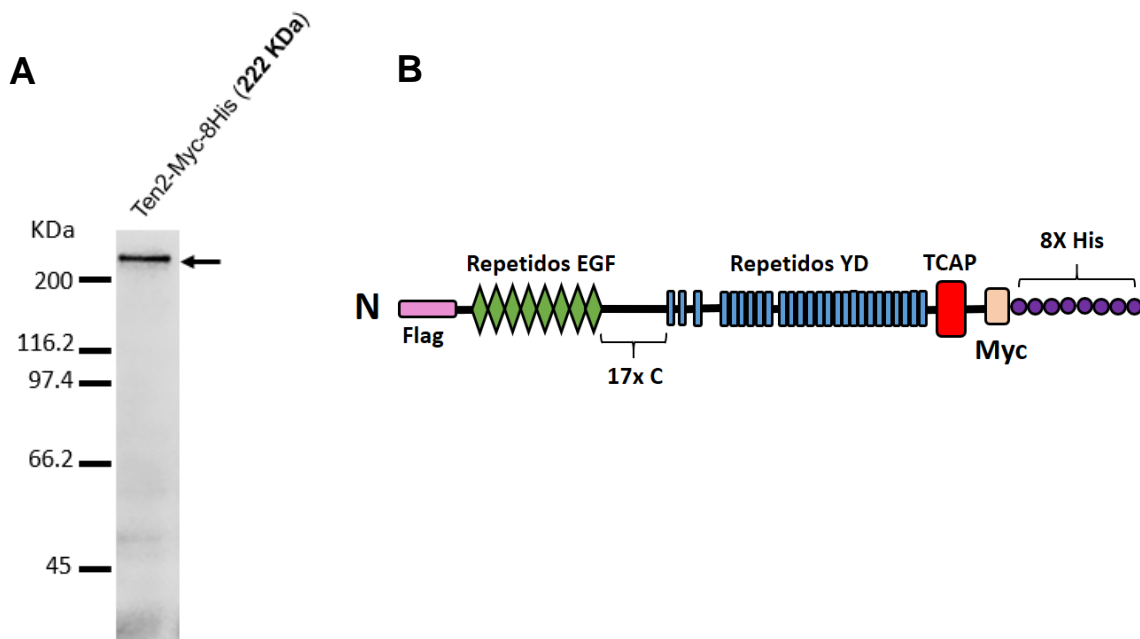


Figura 23. Expresión de la proteína Ten2-Myc-8His por células HEK-293 transfectadas con PEI. **A.** Análisis utilizando un anticuerpo anti-Myc de la expresión de Ten2-Myc-8His en células transfectadas. La flecha indica la banda que corresponde a la proteína recombinante esperada. **B.** Esquema de la arquitectura estructural de Ten2-Myc-8His.

Para corroborar que el ligando endógeno soluble Ten2-Myc-8His se unía al receptor latrofilina-1, se realizaron ensayos de marcaje de la superficie celular. Las células HEK-293T transfectadas con la variante Lphn-1^{-SSB} Venus (señal verde) se incubaron con medio celular que contenía dicha proteína recombinante. Empleando un anticuerpo anti-Myc de ratón y un anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo Alexa 633 (señal en rojo) se detectó a la Ten2-Myc-8His, indicando que la nueva proteína recombinante se unía al receptor latrofilina-1 en la superficie celular (Figura 24).

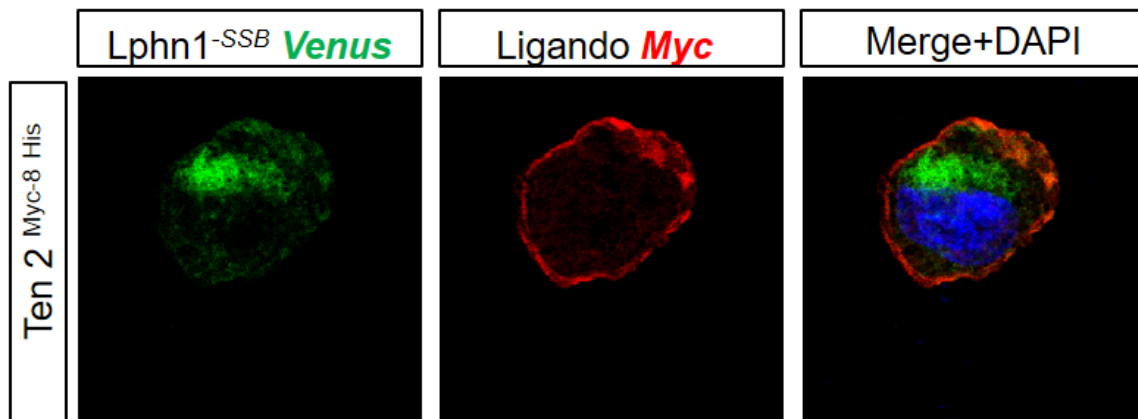


Figura 24. El marcaje de superficie celular muestra que el ligando endógeno soluble Ten2^{Myc-8His} se une a la variante Lphn-1^{-SSB} Venus. Las células HEK-293T transfectadas con la variante Lphn-1^{-SSB} Venus fueron incubadas con medio de cultivo que contenía Ten2^{Myc-8His}, y la inmunodetección se realizó con un anticuerpo anti-Myc de ratón y un anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo Alexa 633 (señal en rojo). Imágenes de un solo experimento realizado.

Los resultados indicaron ausencia de unión específica del ligando endógeno soluble Ten2^{ECD}. Por otra parte, la proteína recombinante Ten2^{Myc-8His} no pudo ser purificada. En consecuencia, ambas proteínas no pudieron ser utilizadas en los ensayos funcionales.

5.4.2 Ensayo de saturación de unión de ligando

Para determinar la afinidad con que el receptor latrofilina-1 unía los ligandos solubles sintéticos, las células HEK-293T fueron transfectadas con Lphn-1^{ECD} TM (que contiene la parte extracelular de la proteína y un dominio transmembranal) y se incubaron con concentraciones crecientes de los ligandos FLRT3^{ECD} (0.195-25 nM) o Nrnx-1 β ^{ECD} (4.69-300 nM).

La unión al receptor se determinó mediante una reacción colorimétrica, producto de la reacción enzimática de la peroxidasa de rábano por un sustrato colorimétrico (Figura 25A). Con los valores de absorbancia se generó la curva de unión de ligando, y la afinidad se determinó con regresión no lineal. La constante de disociación (K_d) para FLRT3^{ECD} correspondió a 0.60 ± 0.05 nM con una unión máxima (B_{max}) de 0.044 ± 0.020 unidades de absorbancia (OD), y para Nrnx-1 β ^{ECD} la K_d correspondió a 41.4 ± 4.7 nM con un valor de B_{max} de 0.044 ± 0.021 unidades de absorbancia (Figura 25, B y C).

5.5 Efecto de la activación de las variantes de la latrofilina-1 (Lphn-1^{SSB} y Lphn-1^{+SSB}) en la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$)

Se ha reportado que la latrofilina-1 aumenta la concentración intracelular de calcio al ser estimulada con teneurina-2 o α -latrotoxina (ligandos endógeno y exógeno, respectivamente), efecto que puede atribuirse a la activación de proteínas $G_{\alpha_q/11}$ (34). Por ello, se evaluó el efecto de las variantes de la latrofilina-1 en la $[Ca^{2+}]_i$, en células HEK-293T que expresan cada variante de la latrofilina-1, pre-incubadas con el indicador de calcio Fura-2, y en respuesta a la incubación con ligandos endógenos (Nrnx-1 β ^{ECD} o FLRT3^{ECD}). Sin embargo, ninguna variante aumentó la concentración intracelular de calcio en respuesta al ligando (Figura 26). Para determinar que la maquinaria de movilización de calcio de las células utilizadas era funcional, los receptores purinérgicos expresados de manera endógena por las células HEK-293T fueron activados con ATP (10 μ M) en presencia de tapsigargina

(1 μM). Estos resultados indican que ambas variantes de la latrofilina-1 no activan proteínas $G\alpha_{q/11}$.

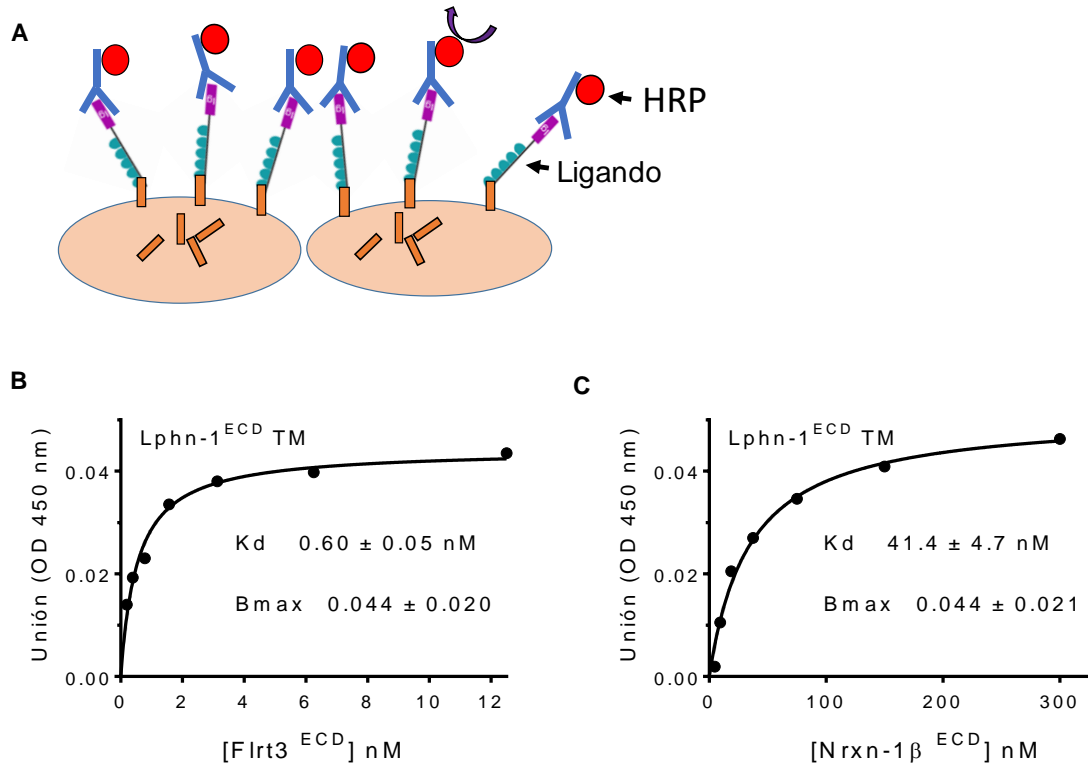


Figura 25. El receptor latrofilina-1 une con alta afinidad a los ligandos endógenos solubles FLRT3^{ECD} y Nr xn-1 β ^{ECD}. A. Representación esquemática del ensayo de saturación de unión de ligandos, utilizando un anticuerpo acoplado a la peroxidasa de rábano. Las células HEK-293T que expresan a la latrofilina-1 se incubaron con las concentraciones indicadas de FLRT3^{ECD} (**B**) o Nr xn-1 β ^{ECD} (**C**), y la unión específica fue determinada mediante la sustracción de la unión inespecífica (absorbancia obtenida de células transfectadas con el vector vacío) de la unión total. La curva es el mejor ajuste a una hipérbola. Los valores de la constante de disociación al equilibrio (K_d) y de la unión máxima (B_{max}) son el promedio \pm SEM de 4 experimentos.

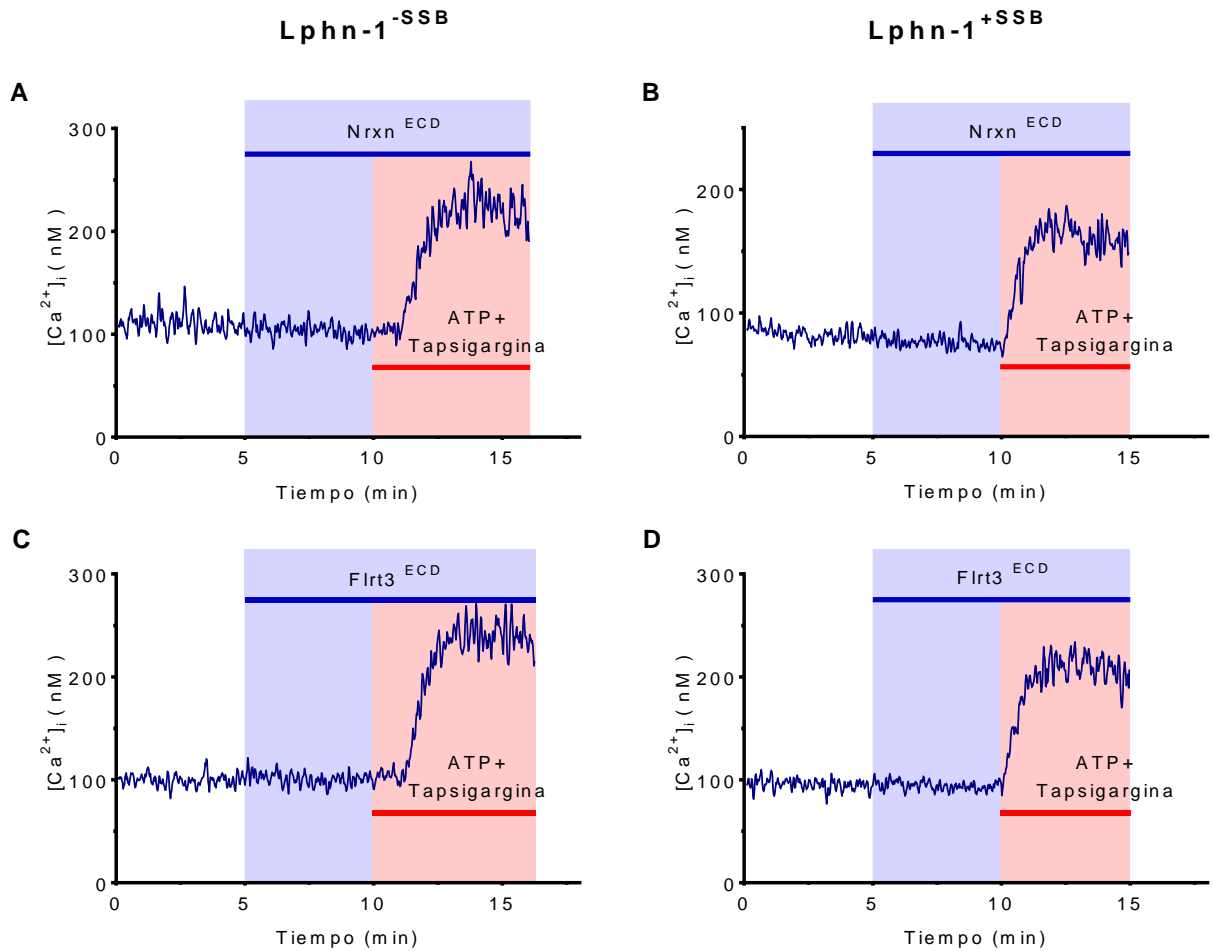


Figura 26. Efecto de la activación de las variantes ($Lphn-1^{-SSB}$, $Lphn-1^{+SSB}$) del receptor latrofilina-1 en la $[Ca^{2+}]_i$. Las células HEK-293T transfectadas con cada variante de la latrofilina-1 se incubaron con Fura-2 (1 μ M) antes de exponerse a los ligandos ($Nrxn^{ECD}$, 300 nM; **A** y **B**) o ($FLRT3^{ECD}$; 10 nM; **C** y **D**) por los tiempos indicados en las figuras. Los receptores purinérgicos endógenos se estimularon con ATP (10 μ M) en presencia de tapsigargina (1 μ M) para comprobar la funcionalidad de la maquinaria de liberación de Ca^{2+} . Trazos representativos de 3 experimentos realizados.

5.6 Efecto del SSB en la actividad constitutiva de la latrofilina-1

Los GPCRs pueden tener actividad constitutiva o intrínseca, definida como la capacidad del receptor para activar vías de señalización sin la activación del receptor por un agonista, efecto debido al equilibrio de los estados energéticos activos e inactivos del receptor. La posible activación constitutiva de proteínas $G\alpha_s$ por la latrofilina-1 se evaluó por ensayos de acumulación de AMPc en células HEK-293T transfectadas con cantidades crecientes (200-800 ng/pozo, cajas de 24 pozos) de los plásmidos que codifican cada variante de la latrofilina-1. La variante $Lphn-1^{+SSB}$ indujo un aumento significativo en la acumulación de AMPc, sin observarse efecto de la variante $Lphn-1^{-SSB}$ (Figura 27). De manera relevante, la actividad constitutiva no dependió de la cantidad de ADN utilizado en la transfección.

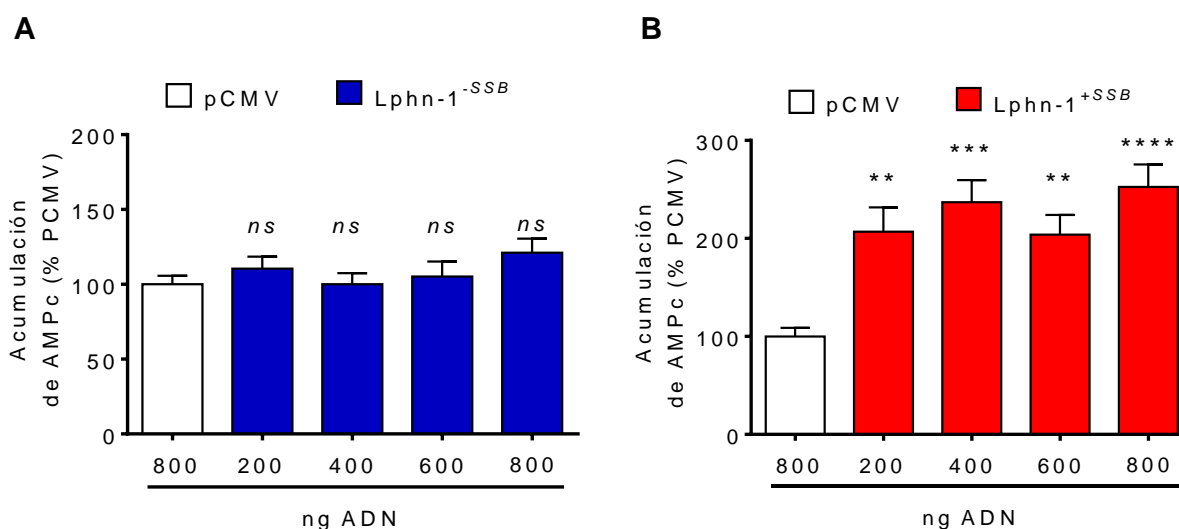


Figura 27. Efecto del SSB en la actividad constitutiva del receptor latrofilina-1. Las células HEK-293T transfectadas con 200-800 ng del plásmido que codifica las dos variantes del receptor latrofilina-1, $Lphn-1^{-SSB}$ (A) o $Lphn-1^{+SSB}$ (B), fueron incubadas en solución KRH conteniendo 1 mM de IBMX por 45 min a 37°C. Los valores corresponden a la acumulación de AMPc expresada como porcentaje del control (pCMV) y son promedios \pm SEM de 6 ó 8 experimentos para $Lphn-1^{-SSB}$ ó 6 experimentos para $Lphn-1^{+SSB}$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$; ns, no estadísticamente significativo con respecto al control (pCMV); ANOVA de una vía y prueba de Dunnett.

5.7 Efecto de la activación por ligandos endógenos de la latrofilina-1 en la formación de AMPc

Las células HEK-293T fueron transfectadas con cada variante, Lphn-1^{-SSB} o Lphn-1^{+SSB}, y se incubaron en ausencia o presencia de FLRT3^{ECD} (10 nM) o Nrxn-1 β ^{ECD} (300 nM). Ambos ligandos aumentaron la formación de AMPc en las células transfectadas con la variante Lphn-1^{+SSB}, sin inducir efecto alguno en las células que expresaban la variante Lphn-1^{-SSB} (Figura 28).

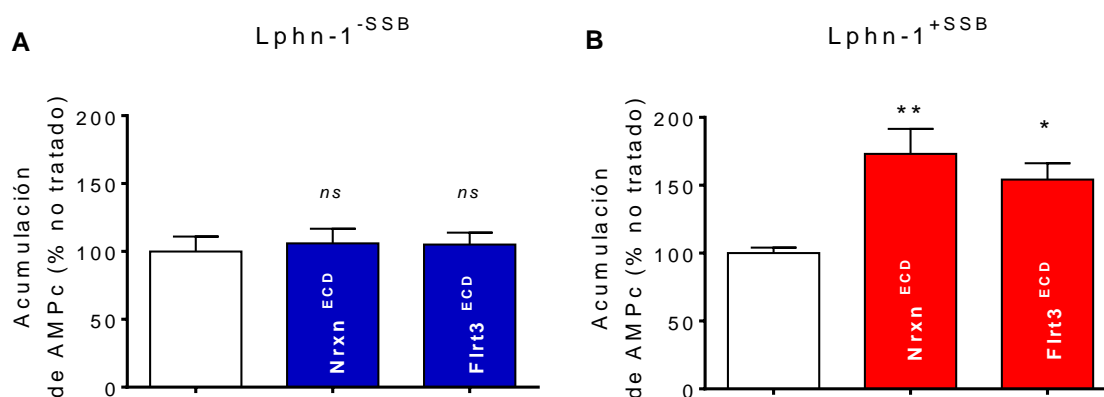


Figura 28. Efecto de la activación por ligandos endógenos de las variantes Lphn-1^{-SSB} (A) o Lphn-1^{+SSB} (B) del receptor latrofilina-1 en la formación de AMPc. Las células HEK-293T transfectadas con cada variante de la latrofilina-1 fueron incubadas con FLRT3^{ECD} (10 nM) o Nrxn-1 β ^{ECD} (300 nM) en solución KRH conteniendo 1 mM de IBMX por 30 min a 37°C. Los valores corresponden a la acumulación de AMPc expresada como porcentaje del control (latrofilina-1), y son el promedio \pm SEM de 3 experimentos; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ns, no estadísticamente significativo con respecto al control (no tratado); ANOVA de una vía y prueba de Dunnett.

5.8 Inhibición de la acumulación de AMPc inducida por forskolina

La variante Lphn-1^{-SSB} no indujo acumulación de AMPc, lo que sugiere que no activa proteínas G_{α_s} . Por lo tanto, se evaluó si ambas variantes podrían activar proteínas $G_{\alpha_i/o}$, que disminuyen la acumulación de AMPc por inhibición de las adenil ciclasas.

En células HEK-293T transfectadas con cada variante de la latrofilina-1, y expuestas a FLRT3^{ECD} (10 nM) o Nrxn-1 β ^{ECD} (300 nM), la activación de la variante Lphn-1^{-SSB} redujo significativamente la acumulación de AMPc inducida por forskolina (Figura 29A). De manera inesperada, se observó el mismo efecto con la variante Lphn-1^{+SSB} con ambos ligandos endógenos (Figura 29B). En células transfectadas con el vector vacío y expuestas a las mismas concentraciones de FLRT3^{ECD} o Nrxn-1 β ^{ECD}, no se advirtió cambio alguno (Figura 29E), indicando que el efecto de los ligandos se debe a la activación del receptor.

Para evaluar la participación de las proteínas $G_{\alpha_i/o}$ en el efecto de la activación de ambas variantes de la latrofilina-1, se utilizó la toxina de *Bordetella pertussis* (PTX), que inhibe la activación de dichas proteínas por los receptores acoplados a ellas. Para ambas variantes de la latrofilina-1, la pre-incubación con la PTX previno el efecto inhibitorio de su activación en la acumulación de AMPc (Figura 29, A y B), lo que indica que ambas isoformas activan proteínas $G_{\alpha_i/o}$.

De manera relevante, en células transfectadas con la variante Lphn-1^{+SSB}, tratadas con PTX y en ausencia de ligando, la acumulación de AMPc aumentó de manera significativa en comparación con células no tratadas con la toxina y este efecto no se observó para la variante Lphn-1^{-SSB}. Este resultado sugiere que la variante Lphn-1^{+SSB} activa de manera constitutiva a proteínas $G_{\alpha_i/o}$ (Figura 29, A y B).

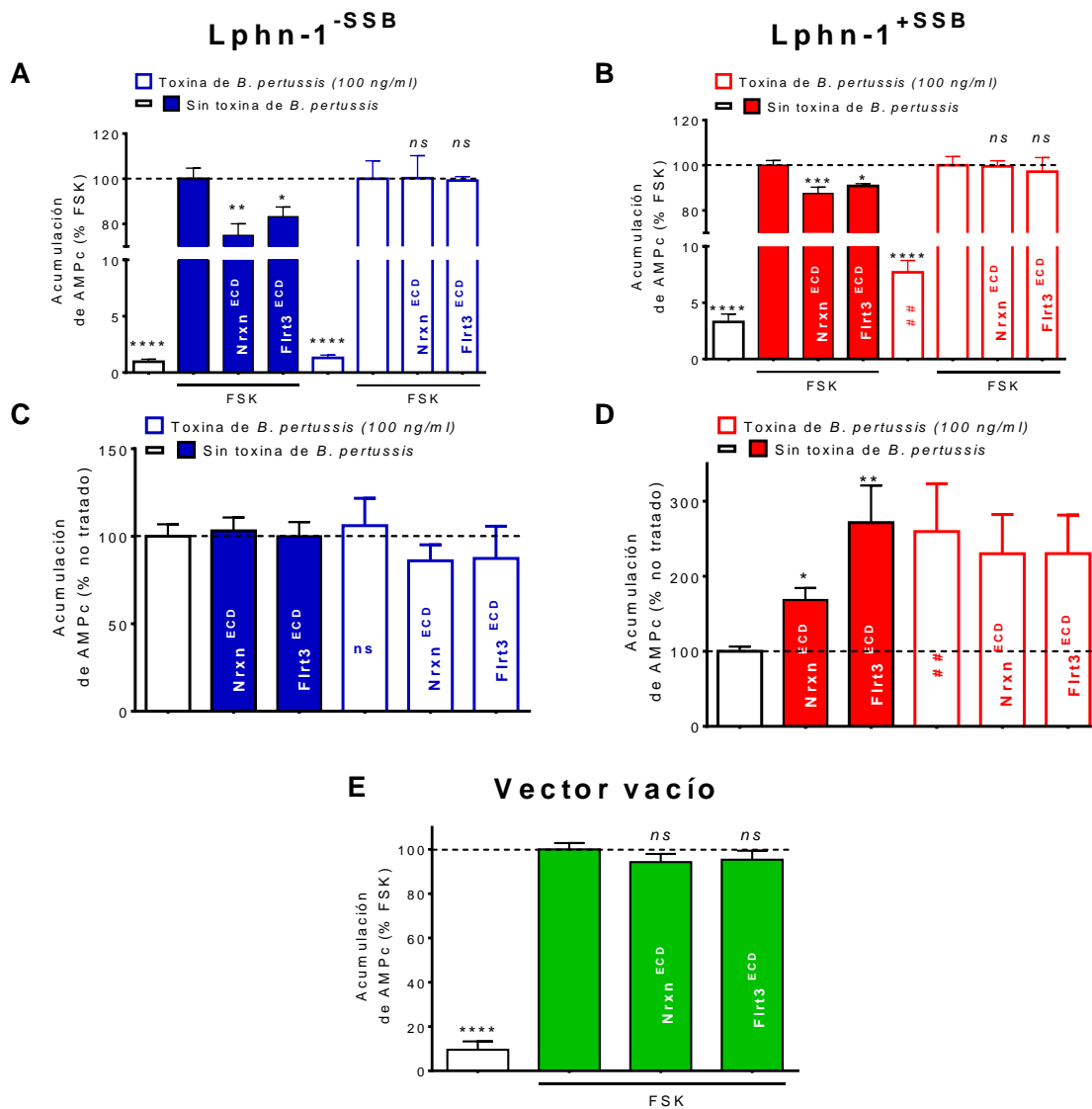


Figura 29. Efecto de activación de las variantes (Lphn-1^{-SSB} y Lphn-1^{+SSB}) del receptor latrofilina-1 en la acumulación de AMPc.

La leyenda se presenta en la siguiente página.

Figura 29. Efecto de activación de las variantes (Lphn-1^{-SSB} y Lphn-1^{+SSB}) del receptor latrofilina-1 en la acumulación de AMPc. A, B. Efecto de la toxina de *B. pertussis* (PTX) en la acumulación de AMPc inducida por forskolina (FSK). Las células HEK-293T transfectadas con cada variante de la latrofilina-1 fueron incubadas en ausencia o presencia de la PTX (100 ng/ml, 16 h) antes de incubarse por 30 min con FSK (10 μ M) 10 min después de adicionar los ligandos FLRT3^{ECD} (10 nM) o Nr1h3-1 β ^{ECD} (300 nM). Los valores corresponden al promedio \pm SEM de 3 experimentos. **C y D.** Efecto de la PTX en la acumulación de AMPc inducida por ligandos. Las células HEK-293T transfectadas con cada variante del receptor latrofilina-1 fueron incubadas en presencia o ausencia de la PTX antes de la exposición a los ligandos FLRT3^{ECD} (10 nM) o Nr1h3-1 β ^{ECD} (300 nM); los valores corresponden al promedio \pm SEM de 3 experimentos. **E.** Las células HEK-293T transfectadas con el vector vacío (pCMV) fueron incubadas por 30 min con FSK (10 μ M) 10 min después de adicionar los ligandos FLRT3^{ECD} (10 nM) o Nr1h3-1 β ^{ECD} (300 nM); los valores corresponden al promedio \pm SEM de 4 experimentos. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$. ns, no estadísticamente significativo, con respecto al control (FSK en A, B, y E; latrofilina-1 en C y D). #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; con respecto al control (latrofilina-1 en A y B). El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía y la prueba de Dunnett.

5.9 Efecto de la toxina de la *Bordetella pertussis* (PTX) en la acumulación de AMPc inducida por ligando

Los ensayos de acumulación de AMPc sugerían que la variante Lphn-1^{+SSB} activaba tanto proteínas G_{α_s} como $G_{\alpha_{i/o}}$ de manera constitutiva o al ser estimulada por ligandos endógenos, por lo que se hipotetizó que la variante Lphn-1^{-SSB} podría también activar ambas proteínas G. Sin embargo, si el efecto funcional de la activación de las proteínas $G_{\alpha_{i/o}}$ fuera mayor que el inducido por las proteínas G_{α_s} , podría ocultar el efecto de las proteínas G_{α_s} . En este contexto, la acción de la PTX aislaría el efecto de las proteínas G_{α_s} , al prevenir la funcionalidad de las proteínas $G_{\alpha_{i/o}}$.

Para evaluar esta posibilidad, células HEK-293T que expresaban cada variante de la latrofilina-1 fueron pre-incubadas en ausencia o presencia de la PTX y

posteriormente incubadas con los ligandos endógenos solubles. Para la variante Lphn-1^{-SSB} la PTX no modificó la acumulación de AMPc en ausencia o en presencia de los ligandos endógenos; sin embargo, para la variante Lphn-1^{+SSB} la pre-incubación con la PTX aumentó la acumulación de AMPc en ausencia de ligandos, pero no potenció el efecto estimulador de los ligandos (Figura 29, C-D). Estos resultados sugieren que la activación por ligando de la variante Lphn-1^{-SSB} induce la activación de proteínas $G_{\alpha_{i/o}}$, pero no de proteínas G_{α_s} ; en contraste, la variante Lphn-1^{+SSB} activa tanto proteínas G_{α_s} como proteínas $G_{\alpha_{i/o}}$, de manera constitutiva y al ser activada por ligandos endógenos (Figura 29, B-D).

5.10 Efecto de la activación de las variantes de la latrofilina-1 (Lphn-1^{-SSB}, Lphn-1^{+SSB}) en la fosforilación de las MAP cinasas

Se ha reportado que los GPCRs que se acoplan a proteínas $G_{\alpha_{i/o}}$, como los receptores a histamina H_3 y a dopamina D_2 , inducen la fosforilación de las MAP cinasas (ERK-1/2) y que este efecto se debe primordialmente al dímero $G_{\beta\gamma}$ (62, 63). Los experimentos de acumulación de AMPc indicaban que ambas variantes de la latrofilina-1 activaban proteínas $G_{\alpha_{i/o}}$, por lo que se evaluó si estas variantes inducían la fosforilación de las MAP cinasas. Células HEK-293T transfectadas con cada variante de la latrofilina-1 se incubaron con Nr1h3^{ECD} (300 nM) por 0-20 min y como control se utilizó suero fetal bovino (SFB). Ambas variantes de la latrofilina-1 no activaron MAP cinasas, como sí lo hizo el suero fetal bovino (FBS), utilizado como control positivo (Figura 30).

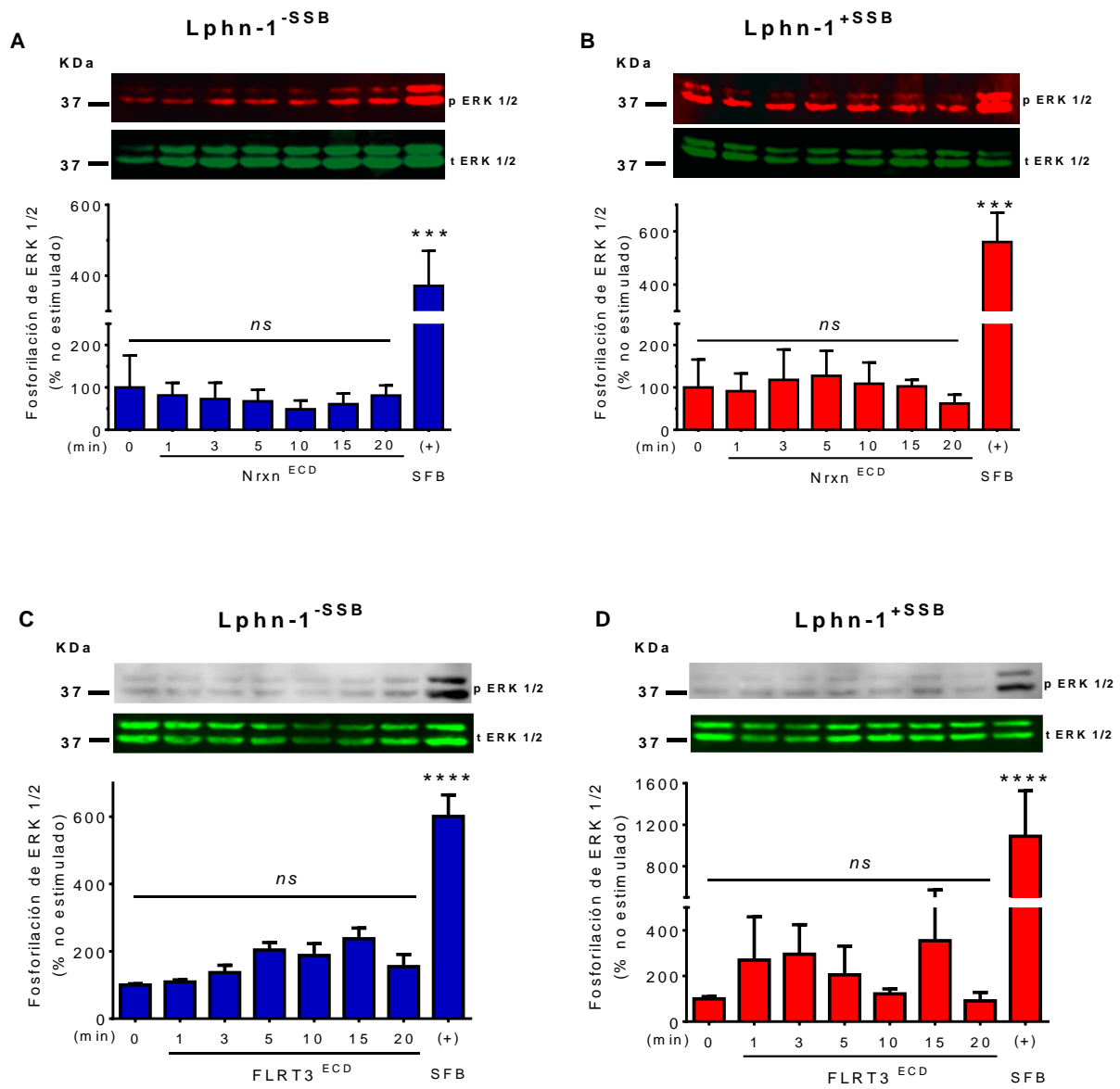


Figura 30. Efecto de la activación de las variantes (Lphn-1^{-SSB}, Lphn-1^{+SSB}) del receptor latrofilina-1 en la fosforilación de MAP cinasas (ERK-1/2).

La leyenda se presenta en la siguiente página.

Figura 30. Efecto de la activación de las variantes Lphn-1^{-SSB} y Lphn-1^{+SSB} de la latrofilina-1 en la fosforilación de MAP cinasas (ERK-1/2). **A y B**, Ausencia de efecto del ligando Nr1h3^{ECD}. Las células transfectadas con las variantes Lphn-1^{-SSB} y Lphn-1^{+SSB} de la latrofilina-1 se incubaron con Nr1h3^{ECD} (300 nM) por los tiempos indicados. SFB, suero fetal bovino. **C y D**, Ausencia de efecto del ligando FLRT3^{ECD}. Las células transfectadas con las variantes Lphn-1^{-SSB} y Lphn-1^{+SSB} se incubaron con FLRT3^{ECD} (10 nM) por los tiempos indicados. SFB, suero fetal bovino. Las gráficas representan el promedio de 3 experimentos. *ns*, no estadísticamente significativo con respecto al control (no estimulado, min 0); *** $P < 0.001$, ****, $P < 0.0001$; ANOVA de una vía y prueba de Dunnett.

5.11 Análisis genómico del SSB de la latrofilina-1 de diferentes especies de mamíferos

Los mecanismos del procesamiento alternativo del gen Lphn-1 en diferentes especies de mamíferos no se conocen. Para la rata (*R. norvegicus*) se reportó por primera vez la secuencia del SSB en clonas EST (*expressed sequence tags*), por lo que en este trabajo se realizaron alineamientos múltiples de las secuencias de amino ácidos y del ARNm del gen Lphn-1 de diferentes especies de mamíferos (*R. norvegicus*, *M. musculus* (ratón), *M. mulatta* (macaco Rhesus), *C. lupus familiaris* (perro), *H. sapiens* (humano), *P. troglodytes* (chimpancé común), *B. taurus* (bovino), y *E. caballus* (caballo)), empleando a la secuencia de la rata como referencia. Las secuencias de ARNm y de los transcritos genómicos fueron obtenidas de las bases de datos de NCBI y Ensembl, y se analizaron con el programa Clustal Omega en su configuración MAFFT (*Multialignment using Fast Fourier Transform*).

El análisis de las secuencias de ARNm indicó que la secuencia que codifica el SSB se localiza entre los exones 21 y 22 en el gen Lphn-1 de la rata, en una región intrónica, lo que sugiere que el procesamiento se debe a retención intrónica (Figura 31A). Este inserto está presente en la rata, el ratón, el macaco y el perro, con un porcentaje de conservación muy alto en la rata y el ratón, y un bajo porcentaje en el macaco y el perro (Figura 31B).

Las secuencias flanqueantes exónicas ubicadas en la unión intrón-exón tienen 100% de homología en todos los organismos analizados. De manera interesante, en los genes de la rata, ratón, macaco, perro, bovino y caballo se encuentra la secuencia canónica donadora y aceptora (GT-AG) para el procesamiento alternativo; sin embargo, en la rata, el ratón, el macaco y el perro se observó la retención del intrón 21 y, en contraste, en el humano y el chimpancé no se detectó este proceso, indicando la ausencia del inserto SSB. A pesar de ello, el análisis de RNA-Seq indicó la detección de transcritos en esta región intrónica de forma parcial, probablemente por la presencia de codones de paro (ver Anexos).

En contraparte, en el humano y el chimpancé la secuencia de este intrón mostró 100% de homología, siendo diferente de la secuencia del macaco. Estos resultados sugieren que el inserto SSB pudo haberse restringido a unos pocos genomas, probablemente como resultado de un proceso evolutivo (ver Figura 31).

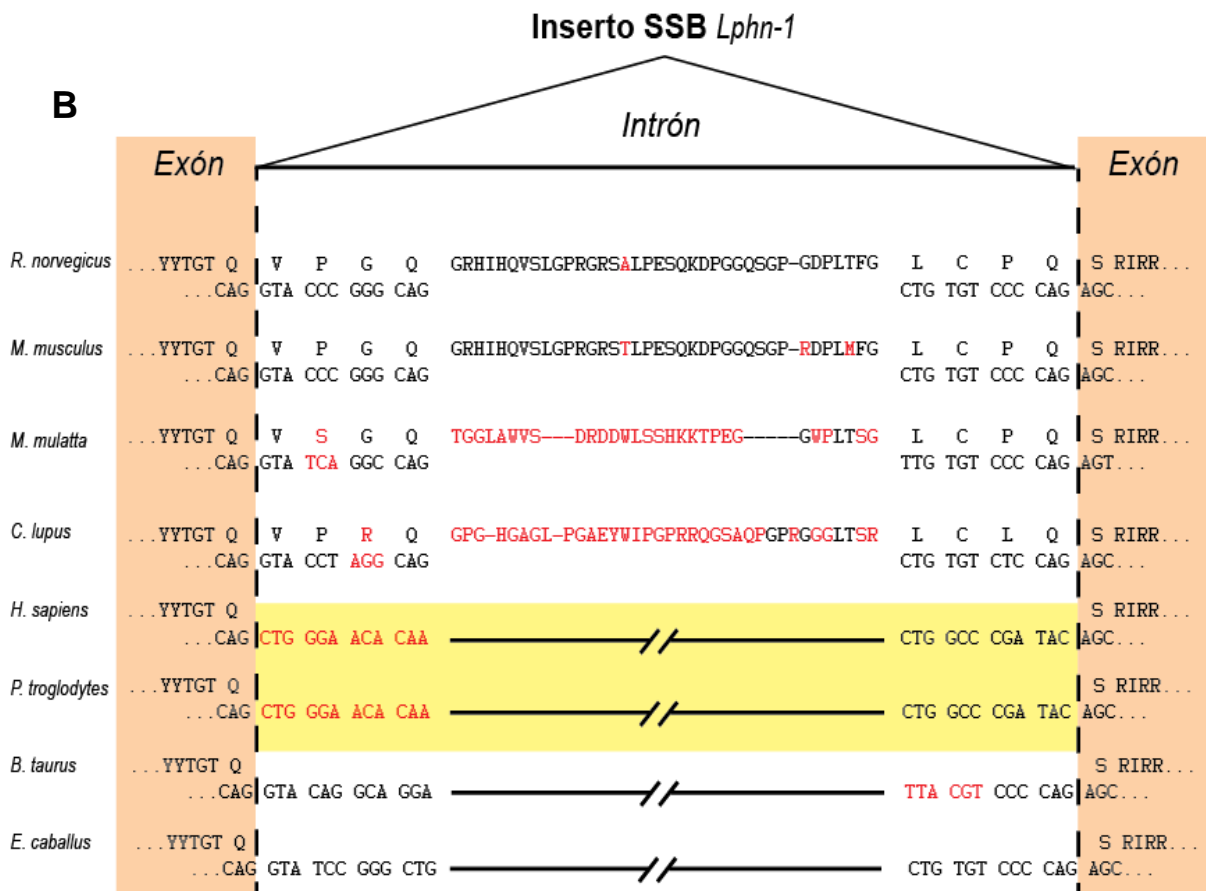
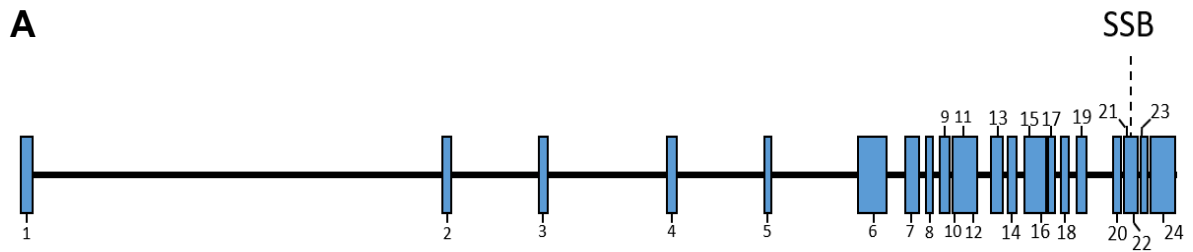


Figura 31. Análisis genético del inserto SSB de la latrofilina-1 en el genoma de diferentes mamíferos.

La leyenda se presenta en la siguiente página.

Figura 31. Análisis genético del inserto SSB de la latrofilina-1 en el genoma de diferentes mamíferos. **A**, estructura del gen de la latrofilina-1 de la rata (*R. norvegicus*). Los exones se numeran (1 a 24) y se representan con cuadros azules; se indica el sitio de procesamiento alternativo B (SSB) entre los exones 21 y 22. **B**, Alineamiento múltiple de la secuencia de ARNm y transcripciones genómicas del gen de la latrofilina-1 de diferentes especies de mamíferos. Se indica la presencia del inserto SSB en *R. norvegicus*, *M. musculus*, *M. mulatta* y *C. lupus*. Las letras en negro indican las secuencias con alto nivel de similitud, ya sea en nucleótidos o en amino ácidos, con respecto a la secuencia de *R. norvegicus* (secuencia de referencia). El cuadro amarillo indica las secuencias genómicas del *H. sapiens* y *P. troglodytes* con alto nivel de similitud entre ellas. Las especies analizadas fueron: Rata (*R. norvegicus*), ratón (*M. musculus*), macaco (*M. mulatta*), perro (*C. lupus familiaris*), hombre (*H. sapiens*), chimpancé (*P. troglodites*), bovino (*B. taurus*), y caballo (*E. caballus*).

6. Discusión

La latrofilina-1 pertenece a la subfamilia de GPCRs de adhesión, y en su estructura contiene la secuencia Stachel, un ligando integrado capaz de activar al receptor y desencadenar la señalización intracelular correspondiente. Además, contiene dominios lectina/olfatomedina (LEC/OLF) que le confieren la función de adhesión, y mediante los cuales interactúa trans-sinápticamente con tres tipos de ligandos endógenos: neurexinas (Nrxn), teneurinas (Ten), y FLRT, proteínas de adhesión celular expresadas en neuronas y que participan en la formación, estabilidad y mantenimiento de las sinapsis (21, 32).

Dentro de las formas de procesamiento alternativo que se han descrito para la latrofilina-1 se encuentran el SSA (*alternative splicing site A*) y el SSB (*alternative splicing site B*). El primer sitio se localiza entre las regiones que codifican los dominios LEC/OLF, y el procesamiento conduce a la inserción u omisión de 5 aa en este sitio. El procesamiento en el SSA regula la afinidad de la latrofilina-1 por las teneurinas, sin efecto para los demás ligandos. El segundo sitio (SSB), se localiza en el extremo carboxilo citoplasmático, y el procesamiento conduce a la inserción u omisión de 45 aa en este sitio (Figura 28). Dada su ubicación intracelular es probable que participe de manera importante en el tráfico y la expresión del receptor o en la señalización intracelular. Sin embargo, la función no se conoce con certeza (10). En esta tesis describimos que el SSB confiere a latrofilina-1 la propiedad de señalización dual por proteínas $G\alpha_s$ y proteínas $G\alpha_{i/o}$, sin afectar la expresión del receptor.

El interés por una mayor comprensión de la participación de la latrofilina-1 en los diferentes procesos fisiológicos ha generado una importante línea de investigación, enfocada a explicar cómo esta proteína puede inducir o regular la señalización por el segundo mensajero AMPc, con diversos reportes contradictorios que convierten a la latrofilina-1 en un objetivo de investigación relevante.

En estudios de acumulación de AMPc y de IPs en células COS-7 transfectadas con Lat-1, expresada por *C. elegans* y equivalente al receptor latrofilina-1 de los

mamíferos, Lat-1 aumenta los niveles intracelulares de AMPc de manera constitutiva y al ser estimulada por un péptido sintético de la secuencia Stachel, efecto atribuido a la activación de proteínas $G\alpha_s$; en contraste, en células COS-7 transfectadas con dCirl, expresada por *D. melanogaster* y equivalente a las latrofilinas de mamíferos, un péptido sintético de la secuencia Stachel disminuye la acumulación de AMPc, acción atribuida a la activación de proteínas $G\alpha_{i/o}$ (30, 31). Otros estudios con células COS-7 transfectadas con la latrofilina-1 de la rata indican que este receptor aumenta la formación de AMPc de manera constitutiva y en respuesta al péptido sintético de la secuencia Stachel (31), mientras que otros reportes indican que la expresión en células HEK-293 de la latrofilina-1 disminuye la acumulación de AMPc tanto constitutivamente como en presencia del péptido sintético generado con base en la secuencia Stachel (32).

En conjunto, estos reportes sugieren que la latrofilina-1 puede activar tanto a proteínas $G\alpha_s$ como a proteínas $G\alpha_{i/o}$; sin embargo, este proceso no está del todo claro. Por lo tanto, es factible especular que la latrofilina-1 ha experimentado cambios genéticos o evolutivos, y que estos cambios le han permitido adquirir funciones variables en diversos tejidos de diferentes organismos. Este aspecto funcional se ve reflejado por ejemplo en *C. elegans*, donde Lat-1 es importante para la adecuada alineación de los planos anteriores y posteriores en la división celular, durante la etapa de blastómero, lo que indica que participa en la polaridad celular (32), mientras que en *D. melanogaster* la expresión de dCirl en las neuronas cordotónicas es importante para la adecuada sensibilidad al tacto suave y la retroalimentación propioceptiva durante la locomoción de la larva, indicando participación en la percepción de estímulos mecanosensoriales (29, 30).

En conjunto, la información anterior sugiere que algunos organismos han conservado la arquitectura genética que le confiere a la latrofilina-1 una función dual en la señalización intracelular.

Los procesamientos alternativos son mecanismos moleculares que permiten generar varias proteínas a partir del mismo gen o de genes ortólogos, mismas que pueden tener funciones diferentes. Los sitios de procesamiento alternativo son parte

de la composición genética, y pueden estar conservadas evolutivamente. En este trabajo encontramos que, en el genoma de la rata, el ratón, el perro y el macaco se conserva una forma de procesamiento alternativo, la cual puede ser responsable de que la latrofilina-1 señalice de manera opuesta (aumento y disminución de la formación de AMPc) en la vía AMPc/PKA en diferentes especies (10). El análisis de alineamiento también reveló que los genomas del humano y el chimpancé pudieron haber perdido dicha forma de procesamiento alternativo que está conservada en el macaco, su ancestro común, probablemente por la presencia de codones de paro en dicha región. La conservación de esta forma de procesamiento podía permitir la señalización dual de la latrofilina-1, pero este mecanismo tiene que ser abordado en próximos estudios.

Aunque no se ha descrito el mecanismo que regula esta forma de procesamiento alternativo, se puede especular la participación de las ribonucleoproteínas nucleares heterógenas (hnRNPs) o de las proteínas de unión al tracto de pirimidinas (PTBs). Las hnRNPs pueden reconocer de manera primaria tanto secuencias canónicas (GT-AG) como secuencias no canónicas de reconocimiento por la ribonucleoproteína nuclear pequeña U2 (U2snRNP), así como por otras snRNPs que conforman el "*spliceosoma*". Estas secuencias se localizan en las regiones flanqueantes intrónicas y exónicas, por lo que la unión de las hnRNPs a estas secuencias bloquea la unión de las snRNPs, previniendo el ensamble del *spliceosoma* sobre el ARNm inmaduro, conduciendo así a retención intrónica (64). Las PTBs tendrían un mecanismo similar, pero estas proteínas se unen al tracto de pirimidinas en la secuencia intrónica del RNAm inmaduro, el cual es reconocido por las snRNPs del *spliceosoma*, y el bloqueo por las PTBs no permite el ensamble del *spliceosoma* sobre el RNAm, conduciendo también a retención intrónica (65).

El interés en la capacidad de la latrofilina-1 para acoplarse a diferentes proteínas G se centra no exclusivamente en la vía AMPc/PKA, sino también en las proteínas G involucradas en la movilización de calcio intracelular. Estudios recientes con células COS-7 transfectadas con el receptor latrofilina-1 han descrito que esta proteína no solo señala de manera opuesta en la formación de AMPc, sino que su activación

por un péptido derivado de la secuencia Stachel aumenta la concentración intracelular de calcio, efecto atribuido a la activación de proteínas $G_{\alpha_{q/11}}$ y de la PLC- β , indicando un acople dual de la latrofilina-1 de la rata a proteínas G (31). El acople a proteínas $G_{\alpha_{q/11}}$ también fue reportado en células de neuroblastoma de ratón que expresan endógenamente la latrofilina-1, en las que la exposición al dominio extracelular de la teneurina-2 aumentó la concentración intracelular de calcio, lo que apoya el acople a dichas proteínas G (34). En contraste, un estudio con células HEK-293 transfectadas con la latrofilina-1 o la latrofilina-3 de la rata reportó a la teneurina-2 como agonista que inducía la activación de proteínas $G_{\alpha_{i/o}}$ (66). Estos hallazgos sugieren una función multifacética del receptor latrofilina-1 en la señalización intracelular, y que los ligandos de este receptor se comportan como agonistas, ya que en diferentes protocolos estimulan las vías de señalización evaluadas.

Los ligandos endógenos descritos para la latrofilina-1 son la neurexina-1 β , la teneurina-2, FLRT3 y la contactina 6; sin embargo, las propiedades farmacológicas de estas proteínas al actuar en el receptor latrofilina-1 y la correspondiente señalización intracelular no están bien establecidas (21, 22, 36).

En esta tesis se utilizaron como ligandos los dominios extracelulares de la neurexina-1 β (Nrxn-1 β^{ECD}), de FLRT3 (FLRT3 ECD), y de la teneurina-2 (Ten2 ECD o Ten2 $^{Myc-8His}$); sin embargo, esta última proteína no se empleó en los ensayos funcionales por dos razones: 1) se obtuvo la parte extracelular de la teneurina-2 fusionada a la Fc de la Ig G humana (Ten2 ECD), pero no se observó unión de esta proteína recombinante a la latrofilina-1, lo que podría explicarse por un impedimento estérico o un cambio conformacional inadecuado inducido por la Fc de la Ig G -debido a su tamaño molecular- sobre el dominio TCAP de la teneurina-2, ya que dicho dominio se requiere para la unión de la teneurina-2 a la latrofilina-1; 2) se obtuvo una segunda proteína recombinante (Ten2 $^{Myc-8His}$) que se unía a la latrofilina-1, pero no fue posible su purificación.

Por lo anterior, en los ensayos funcionales se utilizaron Nrnx-1 β ^{ECD} y FLRT3^{ECD}, evaluando la afinidad por la latrofilina-1, ya que en los ensayos realizados se empleó la configuración con la latrofilina-1 como receptor, y Nrnx-1 β ^{ECD} o FLRT3^{ECD} como los ligandos endógenos solubles. En dos estudios previos se ha utilizado la configuración con la latrofilina-1 como el ligando endógeno soluble, con la neurexina-1 β o FLRT3 como los receptores (21, 22). Los valores de afinidad obtenidos fueron similares en ambas configuraciones, lo que sugiere que el cambio de configuración no afectó las propiedades de unión ligando-receptor.

En células HEK-293T transfectadas con cada variante de la latrofilina-1, las proteínas Nrnx-1 β ^{ECD} y FLRT3^{ECD} se comportaron como agonistas, aumentando o disminuyendo la acumulación de AMPc en las células que expresan la variante Lphn-1^{+SSB}, como resultado de la activación de proteínas G α_s o proteínas G $\alpha_{i/o}$, o solo inhibiendo la acumulación de AMPc como resultado de la activación de proteínas G $\alpha_{i/o}$ en las células que expresan la variante Lphn-1^{-SSB}. En ambos casos, los resultados indican que se requiere la interacción ligando-receptor para la señalización intracelular.

Se ha reportado también que la activación de la latrofilina-1 con el dominio extracelular de la teneurina-2 aumenta la concentración intracelular de calcio en células de neuroblastoma de ratón y en neuronas de hipocampo (34); sin embargo, en este trabajo la incubación con Nrnx-1 β ^{ECD} o FLRT3^{ECD} de células HEK-293T que expresan cada variante de la latrofilina-1 no afectó la concentración intracelular del calcio. Los resultados opuestos podrían explicarse por los diferentes sistemas de expresión utilizados en cada trabajo, o bien por la presencia de agonismo sesgado por parte de la teneurina-2, que permitiría la activación de proteínas G $\alpha_{q/11}$, ya que un ligando particular puede inducir cambios conformacionales específicos en el receptor que le permiten activar una proteína G y no otras. Este aspecto requiere ser abordado en otros estudios.

Los GPCRs pueden tener actividad constitutiva o intrínseca, definida como la capacidad del receptor para activar vías de señalización, sin la activación del

receptor por un agonista, debido al equilibrio de los estados energéticos activos e inactivos del GPCR. Esta actividad puede ser evaluada mediante la sobreexpresión del receptor, lo que favorece el número de receptores constitutivamente activos y de complejos receptor-proteínas G, conduciendo a la activación de las proteínas G, y el aumento o disminución de la formación de segundos mensajeros, dependiendo de la proteína G a que se encuentre acoplado el receptor.

En este trabajo se evaluó el efecto del SSB en la actividad constitutiva de la latrofilina-1 (31), observándose que el SSB permite la activación constitutiva de proteínas $G\alpha_s$ y $G\alpha_{i/o}$, con base en el aumento y disminución de la acumulación de AMPc inducidos por la sola expresión del receptor y en respuesta a un péptido sintético de la secuencia Stachel. El aumento constitutivo de la acumulación de AMPc no dependió de la cantidad del plásmido transfectado, lo que puede ser explicado asumiendo que se alcanzó la saturación de la expresión del sistema, y por lo tanto de la formación de AMPc. Por otra parte, se observó un mayor efecto en respuesta a los ligandos (Nrxn-1 β^{ECD} o FLRT3 ECD). Estos datos indican que el SSB confiere a la latrofilina-1 la propiedad de señalización dual por proteínas $G\alpha_s$ y $G\alpha_{i/o}$.

Para explicar cómo el SSB confiere esta propiedad a la latrofilina-1 es conveniente considerar a los GPCRs como moléculas muy dinámicas, ya que se ha estimado que los cambios conformacionales en estas moléculas ocurren en el orden de nanosegundos a microsegundos. Así, conjuntos de conformaciones forman estados conformacionales, y éstos a su vez conforman poblaciones de estados conformacionales. En otras palabras, los GPCRs adquieren un gran número de conformaciones en tiempos muy cortos (67). Para el adrenoceptor β_2 se ha descrito un mecanismo por el cual puede acoplarse tanto a proteínas $G\alpha_s$ como a proteínas $G\alpha_{i/o}$ con un modelo en el que el receptor se acopla preferencialmente a proteínas $G\alpha_s$, lo que lleva a la formación de AMPc y la activación de la PKA, que a su vez fosforila la tercera asa intracelular del receptor, resultando en un cambio conformacional que se refleja en un cambio en la cavidad de acople a la proteína G

del receptor, disminuyendo la apertura de la cavidad de 14 a 10 Å, lo que permite el acople a proteínas $G_{\alpha_{i/o}}$ (67, 68, 69, 70).

Por lo tanto, puede hipotetizarse que el SSB induce la formación de dos poblaciones de estados conformacionales (con niveles energéticos diferentes) del receptor latrofilina-1, con cada población acoplado a un tipo diferente de proteína G, es decir una población con facilitación estérica para el acople a proteínas G_{α_s} e impedimento estérico para proteínas $G_{\alpha_{i/o}}$, y una segunda población con el patrón opuesto, con sesgo hacia las proteínas $G_{\alpha_{i/o}}$. Esta propuesta debe ser abordada en estudios próximos para esclarecer el mecanismo exacto del acople dual a proteínas G por la latrofilina-1.

Nuestros resultados también llevan a una hipótesis para el acoplamiento dual de la variante $Lphn-1^{+SSB}$, postulando que se requiere la funcionalidad de las proteínas $G_{\alpha_{i/o}}$ para una adecuada señalización del receptor, ya que el tratamiento con PTX, que previene la activación de las proteínas $G_{\alpha_{i/o}}$, indujo un aumento en la formación de AMPc en las células que expresaban la variante $Lphn1^{+SSB}$. En esta condición fue notable observar que en presencia de ligandos no se observó una mayor acumulación de AMPc, a pesar de la disponibilidad de adenil ciclasas como lo indica la respuesta a forskolina. En contraste, en células no tratadas con PTX la acumulación basal de AMPc fue menor, pero los ligandos aumentaron la formación del segundo mensajero hasta alcanzar el nivel observado al inhibir la activación de las proteínas $G_{\alpha_{i/o}}$, generando el máximo efecto del sistema en ambos casos. Lo anterior sugiere que las proteínas $G_{\alpha_{i/o}}$ modulan la actividad de las proteínas G_{α_s} en la señalización intracelular de la latrofilina-1; sin embargo, este posible mecanismo de regulación tendrá que ser explorado con más detalle para esclarecer el mecanismo exacto.

Los GPCRs acoplados a proteínas $G_{\alpha_{q/11}}$ aumentan la concentración intracelular de calcio, ya que las subunidades G_{α} de estas proteínas se unen al dominio C2 de la región carboxilo terminal de la PLC- β , activándola e induciendo la formación de IP_3 y el subsecuente aumento en la concentración intracelular de calcio (62, 71). Por

este motivo, se evaluó si ambas variantes de la latrofilina-1 aumentaban la concentración intracelular de calcio, sin que ninguna de ellas indujera aumento alguno, indicando que no activan proteínas $G_{\alpha_q/11}$.

Se ha reportado que los GPCRs que se acoplan a proteínas $G_{\alpha_{i/o}}$ también pueden aumentar la concentración intracelular de calcio a través del dímero $G\beta\gamma$, como se descrito para los receptores a histamina H_3 y a dopamina D_2 (62, 63). A diferencia de las subunidades $G_{\alpha_q/11}$, el dímero $G\beta\gamma$ se une a una región localizada entre el dominio PH y el dominio Y de la PLC- β lo cual induce su activación, la producción de IP_3 , y el aumento en la concentración intracelular de calcio (62, 71). Las variantes del receptor latrofilina-1 utilizadas en este trabajo se transfectaron en células HEK-293T que expresan diferentes isoformas de la fosfolipasa C β , con alta expresión de la isoforma PLC- β_3 , mediana expresión de la enzima PLC- β_1 y muy baja expresión de la isoforma PLC- β_2 , siendo la PLC- β_3 la isoforma más sensible a ser activada por el dímero $G\beta\gamma$ (72, 73).

No obstante que ambas variantes de la latrofilina-1 activan proteínas $G_{\alpha_{i/o}}$ y que las células HEK-293T expresan altos niveles de PLC- β_3 , no se observó efecto en la concentración intracelular de calcio. Ambas variantes de la latrofilina-1 tampoco indujeron fosforilación de las MAP cinasas, proteínas que también son activadas por el dímero $G\beta\gamma$ (72). Estos resultados pueden ser explicados por la modesta inhibición de las adenilil ciclasas en respuesta a la activación de las variantes de la latrofilina-1, indicativa de la estimulación de una cantidad también modesta de proteínas $G_{\alpha_{i/o}}$, lo que se traduciría en una concentración reducida de dímeros $G\beta\gamma$, presumiblemente insuficiente para activar a la PLC- β_3 y por lo tanto la vía de señalización requerida para la movilización de calcio y la fosforilación de las MAP cinasas.

En resumen, los resultados de esta tesis contribuyen a la comprensión de la función del receptor latrofilina-1 en la regulación de la vía de señalización AMPc/PKA, y de su importancia en la conectividad neural. Sin embargo, se requieren más estudios para dilucidar la función del SSB en la fisiología neuronal.

7. Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos, se plantean las siguientes conclusiones:

1. El procesamiento alternativo B (SSB) no afecta la expresión del receptor latrofilina-1 de la rata.
2. El procesamiento alternativo B confiere a la latrofilina-1 señalización constitutiva por proteínas G_{α_s} .
3. El procesamiento alternativo B confiere a la latrofilina-1 señalización dual por proteínas G_{α_s} y proteínas $G_{\alpha_{i/o}}$ (Figuras 32 y 33).

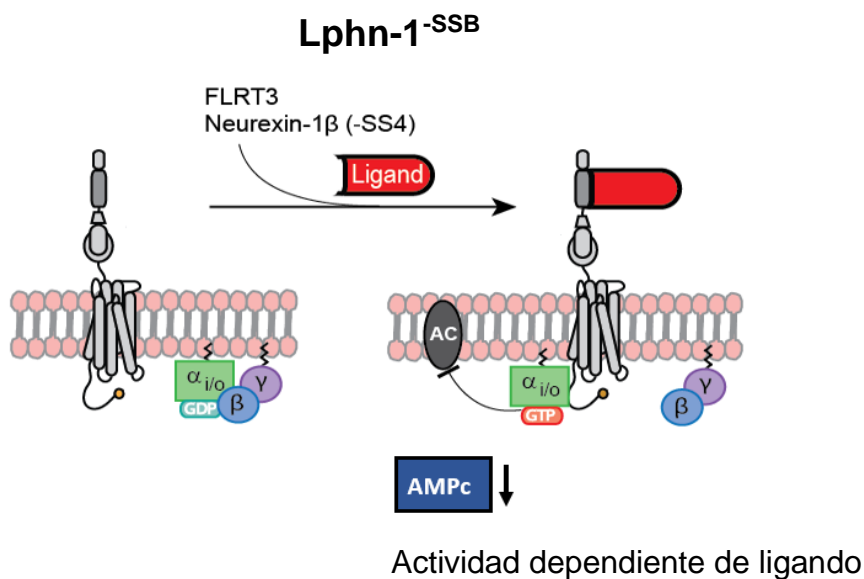


Figura 32. La variante Lphn-1^{-SSB} de la latrofilina-1 activa proteínas $G_{\alpha_{i/o}}$. La estimulación por ligando de la variante Lphn-1^{-SSB} induce la activación de proteínas $G_{\alpha_{i/o}}$, intercambiando GDP por GTP, lo que provoca la separación con el dímero $G_{\beta\gamma}$, dando como resultado la inhibición de las adenilil ciclasas y en consecuencia la reducción de la formación de AMPc.

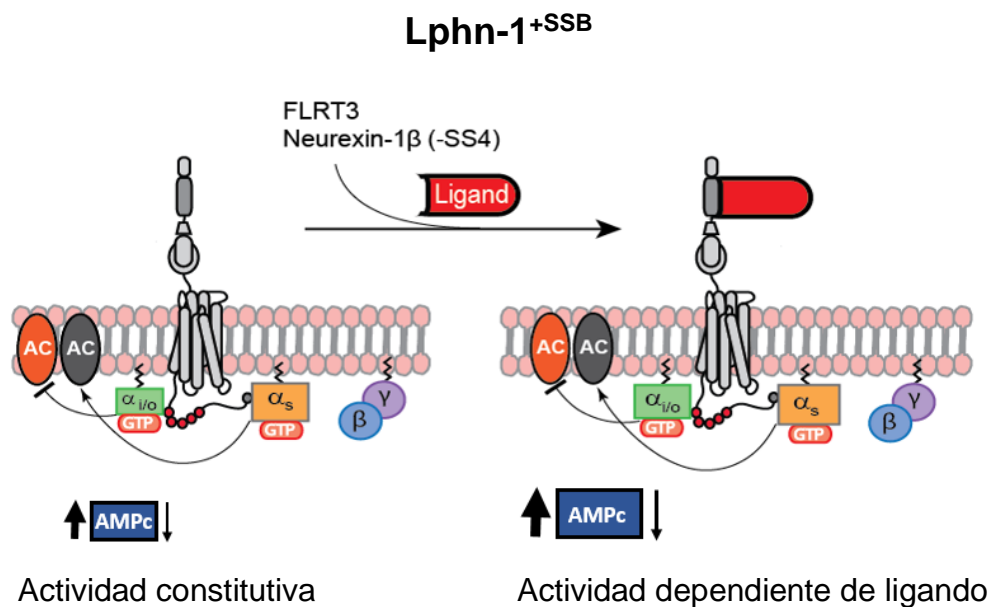


Figura 33. La variante Lphn-1^{+SSB} de la latrofilina-1 activa proteínas G α_s y G $\alpha_{i/o}$. La variante Lphn-1^{+SSB} posee actividad constitutiva para la activación de proteínas G α_s (predominantemente) promoviendo la actividad de las adenilil ciclasas, así como actividad constitutiva para estimular proteínas G $\alpha_{i/o}$, que inhiben la formación de AMPc. El efecto neto sería un aumento en la concentración intracelular de AMPc. La estimulación por ligando de la variante Lphn-1^{+SSB} aumenta los efectos opuestos de las proteínas G α_s y G $\alpha_{i/o}$, resultando también en aumento de la formación de AMPc.

8. Perspectivas

Con base a las observaciones obtenidas en este trabajo de investigación, se plantean como perspectivas del proyecto:

1. Determinar la secuencia de amino ácidos del SSB que confiere a la latrofilina-1 la propiedad de señalización dual por proteínas G.
2. Evaluar el efecto del SSB en la desensibilización del receptor latrofilina-1.
3. Evaluar el efecto del SSB en la formación de las sinapsis y la conectividad neuronal.
4. Determinar el efecto de la Lphn1 en las conductas de apego maternal y la saciedad, así como dilucidar el papel del SSB en dichas conductas.

9. Referencias

1. Gerrow, K., El-Husseini, A. (2006). Cell adhesion molecules at the synapse. *Front Biosci*, 11, 2400-19 doi: 10.2741/1978
2. Missler, M., Sudhof, T. C., Biederer, T. (2012). Synaptic cell adhesion. *Cold spring harb perspect Biol*, 4, a005694. doi: 10.1101/cshperspect.a005694
3. Latorraca, N. R., Venkatakrishnan, A. J., Dror, R. O. (2017). GPCR Dynamics: structures in motion. *Chem Rev*, 117, 139-155. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00177.
4. Kristiansen, K. (2004). Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther*, 103, 21-80. doi: 10.1016/j.pharmthera.2004.05.002
5. Katritch, V., Cherezov, V., Stevens, R. C. (2012). Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 53, 531-56. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-032112-135923.
6. Cabrera-Vera T. M., Vanhauwe, J., Thomas, T. O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni, M. R., Hamm, H. E. (2003). Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev*; 24: 765-81.
7. Duc, N. M., Kim, H. R., Chung, K. Y. (2017). Recent progress in understanding the conformational mechanism of heterotrimeric G protein activation. *Biomol Ther (Seoul)*, 25, 4-11. doi: 10.4062/biomolther.2016.169.
8. Shi, C. S., Kehrl, J. H. (2001). PYK2 links G_qα and G₁₃α signaling to NF-κβ activation. *J Biol Chem*, 276, 31845-50. doi: 10.1074 / jbc.M101043200
9. Marinissen, M. J, Gutkind, J. S. (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci*, 22, 368-76 doi: 10.1016/s0165-6147(00)01678-3.

10. Sugita, S., Ichtchenko, K., Khvotchev, M., Sudhof, T. C. (1998). α -Latrotoxin receptor C1RL/latrophilin 1 (CL1) defines an unusual family of ubiquitous G-protein-linked receptors. G-protein coupling not required for triggering exocytosis. *J Biol Chem*, 273, 32715-32724. doi: 10.1074/jbc.273.49.32715
11. Arac, D., Boucard, A. A., Bolliger, M. F., Nguyen, J., Soltis, S. M., Sudhof, T. C., Brunger, A. T. (2012). A novel evolutionarily conserved domain of cell-adhesion GPCRs mediates autoproteolysis. *Embo J*, 31, 1364-1378. doi: 10.1038/emboj.2012.26
12. Stoveken, H. M., Hajduczuk, A. G., Xu, L., Tall, G. G. (2015). Adhesion G protein-coupled receptors are activated by exposure of a cryptic tethered agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 6194-9. doi: 10.1073/pnas.1421785112.
13. Liebscher, I., Schön, J., Petersen, S. C., Fischer, L., Auerbach, N., Demberg, L. M., Mogha, A., Cöster, M., Simon, K. U., Rothmund, S., Monk, K. R., Schöneberg, T. (2014). A Tethered agonist within the ectodomain activates the Adhesion G Protein-Coupled Receptors GPR126 and GPR133. *Cell Rep*, 10, 1021. doi: 10.1016/j.celrep.2015.01.065.
14. Liebscher, I., Schoneberg, T. (2016). Tethered agonism: A Common Activation Mechanism of Adhesion GPCRs. *Handb Exp Pharmacol*, 234, 111-125. doi: 10.1007/978-3-319-41523-9_6
15. Krasnoperov, V. G., Bittner, M. A., Beavis, R., Kuang, Y., Salnikow, K. V., Chepurny, O. G., Little, A. R., Plotnikov, A. N., Wu, D., Holz, R. W., Petrenko, A., G. (1997). α -Latrotoxin stimulates exocytosis by the interaction with a neuronal G-protein-coupled receptor. *Neuron*, 18, 925-937. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80332-3
16. Lelianova, V. G., Davletov, B. A., Sterling, A., Rahman, M. A., Grishin, E. V., Totty, N. F., Ushkaryov, Y. A. (1997). α -Latrotoxin receptor, latrophilin, is a novel member of the secretin family of G protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, 272, 21504-21508 doi: 10.1074/jbc.272.34.21504

17. 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 USA*, 108, 12113-12118. doi: 10.1073/pnas.1019434108.
18. Collins, M. O., Husi, H., Yu, L., Brandon, J. M., Anderson, C. N., Blackstock, W. P., Choudhary, J. S., Grant, S. G. (2006). Molecular characterization and comparison of the components and multiprotein complexes in the postsynaptic proteome. *J Neurochem*, 97 Suppl 1, 16-23. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03507.x
19. Tobaben, S., Sudhof, T. C., Stahl, B. (2000). The G protein-coupled receptor CL1 interacts directly with proteins of the Shank family. *J Biol Chem*, 275, 36204-36210. doi: 10.1074/jbc.M006448200
20. Kreienkamp, H. J., Zitzer, H., Gundelfinger, E. D., Richter, D., Bockers, T. M. (2000). The calcium-independent receptor for α -latrotoxin from human and rodent brains interacts with members of the ProSAP/SSTRIP/Shank family of multidomain proteins. *J Biol Chem*, 275, 32387-32390. doi: 10.1074/jbc.C000490200
21. Boucard, A. A., Maxeiner, S., Sudhof, T. C. (2014). Latrophilins function as heterophilic cell-adhesion molecules by binding to teneurins: regulation by alternative splicing. *J Biol Chem*, 289, 387-402. doi: 10.1074/jbc.M113.504779
22. Boucard, A. A., Ko, J., Sudhof, T. C. (2012). High affinity neurexin binding to cell adhesion G-protein-coupled receptor CIRL1/latrophilin-1 produces an intercellular adhesion complex. *J Biol Chem*, 287, 9399-9413. doi: 10.1074/jbc.M111.318659
23. Feng, K., Zhou, X. H., Oohashi, T., Mörgelin, M., Lustig, A., Hirakawa, S., Ninomiya, Y., Engel, J., Rauch, U., Fässler, R. (2002). All four members of the Ten-m/Odz family of transmembrane proteins form dimers. *J Biol Chem*, 277, 26128-26135. doi: 10.1074/jbc.M203722200
24. Tobaben, S., Sudhof, T. C., Stahl, B. (2002). Genetic analysis of alpha-latrotoxin receptors reveals functional interdependence of CIRL/latrophilin 1 and neurexin 1 alpha. *J Biol Chem*, 277, 6359-6365. doi: 10.1074/jbc.M111231200

25. Langenhan, T., Prömel, S., Mestek, L., Esmaeili, B., Waller-Evans, H., Hennig, C., Kohara, Y., Avery, L., Vakonakis, I., Schnabel, R., Russ, A. P. (2009). Latrophilin signaling links anterior-posterior tissue polarity and oriented cell divisions in the *C. elegans* embryo. *Dev Cell*, 17, 494-504. doi: 10.1016/j.devcel.2009.08.008
26. Müller, A., Winkler, J., Fiedler, F., Sastradihardja, T., Binder, C., Schnabel, R., Kungel, J., Rothmund, S., Hennig, C., Schöneberg, T., Prömel, S. (2015). Oriented cell division in the *C. elegans* embryo is coordinated by G-Protein signaling dependent on the adhesion GPCR LAT-1. *PLoS Genet*, 11, e1005624. doi: 10.1371/journal.pgen.1005624
27. White, G. R., Varley, J. M., Heighway, J. (1998). Isolation and characterization of a human homologue of the latrophilin gene from a region of 1p31.1 implicated in breast cancer. *Oncogene*, 17, 3513-3519. doi: 10.1038/sj.onc.1202487
28. Zhang, S., Liu, Y., Liu, Z., Zhang, C., Cao, H., Ye, Y., Wang, S., Zhang, Y., Xiao, S., Yang, P., Li, J., Bai, Z. (2014). Transcriptome profiling of a multiple recurrent muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder by deep sequencing. *PLoS ONE*, 9, e91466. doi: 10.1371/journal.pone.0091466
29. Scholz, N., Guan, C., Nieberler, M., Grotemeyer, A., Maiellaro, I., Gao, S., Beck, S., Pawlak, M., Sauer, M., Asan, E., Rothmund, S., Winkler, J., Prömel, S., Nagel, G., Langenhan, T., Kittel, R. J. (2017). Mechano-dependent signaling by Latrophilin/CIRL quenches cAMP in proprioceptive neurons. *Elife*, 6, pii, e28360. doi: 10.7554/eLife.28360
30. Scholz, N., Gehring, J., Guan, C., Ljaschenko, D., Fischer, R., Lakshmanan, V., Kittel, R. J., Langenhan, T. (2015). The adhesion GPCR latrophilin/CIRL shapes mechanosensation. *Cell Rep*, 11, 866-874. doi: 10.1016/j.celrep.2015.04.008
31. Müller, A., Winkler, J., Fiedler, F., Sastradihardja, T., Binder, C., Schnabel, R., Kungel, J., Rothmund, S., Hennig, C., Schöneberg, T., Prömel, S. (2015). Oriented cell division in the *C. elegans* embryo is coordinated by G-Protein signaling dependent on the adhesion GPCR LAT-1. *PLoS Genet*, 11, e1005624. doi: 10.1371/journal.pgen.1005624

32. 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. *Science*, 3, 264-278. doi: 10.1016/j.isci.2018.04.019.
33. Röthe, J., Thor, D., Winkler, J., Knierim, A. B., Binder, C., Huth, S., Kraft, R., Rothmund, S., Schöneberg, T., Prömel, S. (2018). Involvement of the adhesion GPCRs Latrophilins in the regulation of insulin release. *Cell Rep*, 26, 1573-1584.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.01.040.
34. Vysokov, N. V., Silva, J. P., Lelianova, V. G., Suckling, J., Cassidy, J., Blackburn, J. K., Yankova, N., Djamgoz, M. B., Kozlov, S. V., Tonevitsky, A. G., Ushkaryov, Y. A. (2018). Proteolytically released Lasso/teneurin-2 induces axonal attraction by interacting with latrophilin-1 on axonal growth cones. *Elife*, 7, pii, e37935. doi: 10.7554/eLife.37935
35. Cruz-Ortega, J. S., Boucard, A. A. (2019). Actin cytoskeleton remodeling defines a distinct cellular function for adhesion G protein-coupled receptors ADGRL/latrophilins 1, 2 and 3. *Biol Open*, 8, pii, bio039826. doi: 10.1242/bio.039826.
36. Zuko, A., Oguro-Ando, A., Post, H., Taggenbrock, R. L., van Dijk, R. E., Altelaar, A. F., Burbach, J. P. (2016). Association of cell adhesion molecules contactin-6 and Latrophilin-1 regulates neuronal apoptosis. *Front Mol Neurosci*, 10, 6 doi: 10.3389/fnmol.2016.00143
37. Oohashi, T., Zhou, X. H., Feng, K., Richter, B., Mörgelin, M., Perez, M. T., Su, W. D., Chiquet-Ehrismann, R., Rauch, U., Fässler, R. (1999). Mouse ten-m/Odz is a new family of dimeric type II transmembrane proteins expressed in many tissues. *J Cell Biol*, 145, 563-577. doi: 10.1083/jcb.145.3.563
38. Tucker, R. P., Chiquet-Ehrismann, R. (2006). Teneurins: a conserved family of transmembrane proteins involved in intercellular signaling during development. *Dev Biol*, 290, 237-245. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.11.038
39. Maretic, Z. (1983). Latrodectism: variations in clinical manifestations provoked by *Latrodectus* species of spiders. *Toxicon*, 21, 457-466. doi: 10.1016/0041-0101(83)90123-x
40. Dharmaratne, N., Glendining, K. A., Young, T. R., Tran, H., Sawatari, A., Leamey, C. A. (2012). Ten-m3 is required for the development of topography

in the ipsilateral retinocollicular pathway. PLoS ONE, 7, e43083. doi: 10.1371/journal.pone.0043083

41. Merlin, S., Horng, S., Marotte, L. R., Sur, M., Sawatari, A., Leamey, C. A. (2013). Deletion of Ten-m3 induces the formation of eye dominance domains in mouse visual cortex. *Cereb Cortex*, 23, 763-774. doi: 10.1093/cercor/bhs030
42. Suzuki, N., Fukushi, M., Kosaki, K., Doyle, A. D., de Vega, S., Yoshizaki, K., Akazawa, C., Arikawa-Hirasawa, E., Yamada, Y. (2012). Teneurin-4 is a novel regulator of oligodendrocyte differentiation and myelination of small-diameter axons in the CNS. *J Neurosci*, 32, 11586-11599. doi: 10.1523/jneurosci.2045-11.2012
43. Del Toro, D., Carrasquero-Ordaz, M. A., Chu, A., Ruff, T., Shahin, M., Jackson, V. A., Chavent, M., Berbeira-Santana, M., Seyit-Bremer, G., Brignani, S., Kaufmann, R., Lowe, E., Klein, R., Seiradake, E. (2020). Structural basis of Teneurin-Latrophilin interaction in repulsive guidance of migrating neurons. *Cell*, 180, 323-339. doi: 10.1016/j.cell.2019.12.014.
44. Koehnke, J., Katsamba, P. S., Ahlsen, G., Bahna, F., Vendome, J., Honig, B., Shapiro, L., Jin, X. (2010). Splice form-dependence of β -neurexin/neurologin binding interactions. *Neuron*, 67, 61-74. doi: 10.1016/j.neuron.2010.06.001.
45. Davletov, B. A., Krasnoperov, V., Hata, Y., Petrenko, A. G., Sudhof, T. C. (1995). High affinity binding of α -latrotoxin to recombinant neurexin 1 α . *J Biol Chem*, 270, 23903-23905. doi: 10.1074 / jbc.270.41.23903
46. Matsushita, H., Lelianova, V. G., Ushkaryov, Y. A. (1999). The latrophilin family: multiply spliced G protein-coupled receptors with differential tissue distribution. *FEBS Lett*, 443, 348-352. doi: 10.1016/s0014-5793 (99) 00005-8
47. O'Sullivan, M. L., Martini, F., von Daake, S., Comoletti, D., Ghosh, A. (2014). LPHN3, a presynaptic adhesion-GPCR implicated in ADHD, regulates the strength of neocortical layer 2/3 synaptic input to layer 5. *Neural Dev*, 9, 7. doi: 10.1186/1749-8104-9-7
48. O'Sullivan, M. L., Martini, F., von Daake, S., Comoletti, D., Ghosh, A. (2014). LPHN3, a presynaptic adhesion-GPCR implicated in ADHD, regulates the strength of neocortical layer 2/3 synaptic input to layer 5. *Neural Dev*, 9, 7. doi: 10.1186/1749-8104-9-7

49. Sollner, C., Wright, G. J. (2009). A cell surface interaction network of neural leucine-rich repeat receptors. *Genome Biol*, 10, R99. doi: 10.1186/gb-2009-10-9-r99
50. Yamagishi, S., Hampel, F., Hata, K., Del Toro, D., Schwark, M., Kvachnina, E., Bastmeyer, M., Yamashita, T., Tarabykin, V., Klein, R., Egea, J. (2011). FLRT2 and FLRT3 act as repulsive guidance cues for Unc5-positive neurons. *Embo j*, 30, 2920-2933. doi: 10.1038/emboj.2011.189
51. Bottcher, R. T., Pollet, N., Delius, H., Niehrs, C. (2004). The transmembrane protein XFLRT3 forms a complex with FGF receptors and promotes FGF signalling. *Nat Cell Biol*, 6, 38-44. doi: 10.1038/ncb1082
52. Maretto, S., Muller, P. S., Aricescu, A. R., Cho, K. W., Bikoff, E. K., Robertson, E. J. (2008). Ventral closure, headfold fusion and definitive endoderm migration defects in mouse embryos lacking the fibronectin leucine-rich transmembrane protein FLRT3. *Dev Biol*, 318, 184-193. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.03.021
53. Muller, P. S., Schulz, R., Maretto, S., Costello, I., Srinivas, S., Bikoff, E., Robertson, E. (2011). The fibronectin leucine-rich repeat transmembrane protein Flrt2 is required in the epicardium to promote heart morphogenesis. *Development*, 138, 1297-1308. doi: 10.1242/dev.059386
54. Ye, H., Tan, Y. L., Ponniah, S., Takeda, Y., Wang, S. Q., Schachner, M., Watanabe, K., Pallen, C. J., Xiao, Z. C. (2008). Neural recognition molecules CHL1 and NB-3 regulate apical dendrite orientation in the neocortex via PTP α . *EMBO J*, 27, 188-200. doi: 10.1038/sj.emboj.7601939
55. Takeda, Y., Akasaka, K., Lee, S., Kobayashi, S., Kawano, H., Murayama, S., Takahashi, N., Hashimoto, K., Kano, M., Asano, M., Sudo, K., Iwakura, Y., Watanabe, K. (2003). Impaired motor coordination in mice lacking neural recognition molecule NB-3 of the contactin/F3 subgroup. *J Neurobiol*, 56, 252-265. doi: 10.1002/neu.10222
56. 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. doi: 10.3389/fnins.2019.00700. eCollection 2019

57. Ichtchenko, K., Hata, Y., Nguyen, T., Ullrich, B., Missler, M., Moomaw, C., Südhof, T. C. (1995). Neuroligin 1: A splice site-specific ligand for β -Neurexins *Cell*, 81, 435-43 DOI: 10.1016/0092-8674(95)90396-8.
58. Flores-Clemente, C., Osorio-Espinoza, A., Escamilla-Sanchez, J., Leurs, R., Arias, J. M., Arias-Montano, J. A. (2013). A single-point mutation (Ala280Val) in the third intracellular loop alters the signalling properties of the human histamine H₃ receptor stably expressed in CHO-K1 cells. *Br J Pharmacol*, 170, 127-135. doi: 10.1111/bph.12257
59. Leon-Aparicio, D., Pacheco, J., Chavez-Reyes, J., Galindo, J., M., Valdes, J., Vaca, L., Guerrero-Hernandez, A. (2017). Orai3 channel is the 2-APB-induced endoplasmic reticulum calcium leak. *Cell Calcium*, 65, 91-101. doi: 10.1016/j.ceca.2017.01.012.
60. Ahrens, H., Aiyar, N. V, Sharma R. K. (1986). Purification and characterization of adrenocortical adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinases. *Endocrinology*, 8, 2168-79. DOI: 10.1210/endo-118-6-2168
61. Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 260, 3440-50.
62. Rivera-Ramírez, N., Montejo-López, W., López-Méndez, M. C., Guerrero-Hernández, A. Molina-Hernández, A., García-Hernández, U., Arias-Montaña, J. A. (2016). Histamine H₃ receptor activation stimulates calcium mobilization in a subpopulation of rat striatal neurons in primary culture, but not in synaptosomes. *Neurochem Int*, 101, 38-47. doi: 10.1016/j.neuint.2016.10.005.
63. Caldwell, B., Ustione, A., Piston, D. W. (2016). Dopamine Receptor Signaling in MIN6 β -Cells Revealed by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy. *Biophys J*, 111, 609-618. doi: 10.1016/j.bpj.2016.06.026.
64. Wang, E. T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebtkova, I., Zhang, L., Mayr, C., Kingsmore, S. F., Schroth, G. P., Burge, C. B. (2008). Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*, 456, 470-6. doi: 10.1038/nature07509.
65. Luco, R. F., Allo, M., Schor, I. E., Kornblihtt, A. R., Misteli, T. (2011). Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell*, 144, 16-26. doi: 10.1016/j.cell.2010.11.056.

66. Li, J., Shalev-Benami, M., Sando, R., Jiang, X., Kibrom, A., Wang, J., Leon, K., Katanski, C., Nazarko, O., Lu, Y. C., Südhof, T. C., Skiniotis, G., Araç, D. (2018). Structural basis for Teneurin function in circuit-wiring: A toxin motif at the synapse. *Cell*, 173, 735-748.e15. doi:10.1016/j.cell.2018.03.036.
67. Rasmussen, S. G., DeVree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Chae, P. S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J. M., Shah, S. T., Lyons, J. A., Caffrey, M., Gellman, S., H., Steyaert, J., Skiniotis, G., Weis, W. I., Sunahara, R. K., Kobilka, B. K. (2011). Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*, 477, 549-555. doi: 10.1038/nature10361
68. Latorraca, N., R., Venkatakrishnan, A. J., Dror, R. O. (2017). GPCR Dynamics: structures in motion. *Chem Rev*, 117, 139-155. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00177.
69. Liu, R., Ramani, B., Soto, D., De Arcangelis, V., Xiang, Y. (2009). Agonist Dose-dependent Phosphorylation by Protein Kinase A and G Protein-coupled Receptor Kinase Regulates β_2 Adrenoceptor Coupling to Gi Proteins in Cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 284, 32279-87. doi: 10.1074/jbc.M109.021428.
70. Zamah, A. M., Delahunty, M., Luttrell, L. M., Lefkowitz, R. J. (2002). Protein kinase A-mediated phosphorylation of the β_2 -adrenergic receptor regulates its coupling to Gs and Gi. demonstration in a reconstituted system. *J Biol Chem*, 277, 31249-56. doi: 10.1074 / jbc.M202753200
71. Rebecchi, M. J, Pentylala, S. N. (2000). Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev*, 80, 1291-335 doi: 10.1152/physrev.2000.80.4.1291
72. Koch, W. J., Hawes, B. E., Allen, L. F., Lefkowitz, R. J. (1994). Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G $\beta\gamma$ activation of p21^{ras}. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 12706-10. doi: 10.1073 / pnas.91.26.12706
73. Atwood, B. K., Lopez, J., Wager-Miller, J., Mackie, K., Straiker, A. (2011). Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis. *BMC Genomics*, 12, 14. doi: 10.1186/1471-2164-12-14.

74. Poenie, M. (1990). Alteration of intracellular Fura-2 fluorescence by viscosity: a simple correction. *Cell Calcium*, 11, 85-91. doi:10.1016/0143-4160(90)90062-y

Anexos

Descripción de las bases de datos utilizadas

dbEST

La base de datos dbEST (Nature Genetics 4: 332-3; 1993) es una división del GenBank que contiene datos de secuencias e información adicional sobre secuencias de ADNc o *Expressed Sequence Tags* (EST) de varios organismos. Se encuentra disponible una breve descripción de la historia de las tecnologías utilizadas en cada estudio y reportada en la base de datos GenBank (Trends Biochem Sci 20: 295-6; 1995). Además, contiene el número especial *Genome Directory* de la revista *Nature* (vol. 377, número 6547S, 28 de septiembre de 1995).

GENCODE

El Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano (NHGRI) promovió la creación de un consorcio de investigación pública llamado ENCODE, por sus siglas en inglés (Encyclopedia of DNA Elements) que contiene elementos funcionales en la secuencia del genoma humano. Recientemente se modificó para ampliar el proyecto con la denominación GENCODE para la anotación integrada de las características genéticas.

Después de haber generado la anotación definitiva de elementos funcionales en el genoma humano, la base de datos GENCODE experimentó nuevamente una ampliación para incluir la anotación del genoma del ratón.

ENA

Los *European Nucleotide Archives* (ENA) fueron publicados en 1982 como el primer recurso con apoyo internacional para datos de secuencias de nucleótidos, constituyendo una base de datos que proporciona acceso gratuito a anotaciones de secuencias de ADN y ARN. También almacena información complementaria como procedimientos experimentales, detalles del ensamblaje de secuencias y otros metadatos relacionados con proyectos de secuenciación. Esta base de datos se

divide en tres sub-bases de datos: archivos de lectura de secuencia cortas (RNA-Seq), archivos de seguimiento y secuencias de nucleótidos EMBL (también conocida como banco EMBL). ENA es administrada por el Instituto Europeo de Bioinformática y es miembro de la Colaboración internacional de Bases de Datos de Secuencias de Nucleótidos (INSDC) junto con el banco de datos de ADN de Japón y el GenBank.

Metodología

Los programas usados para el análisis de RNA-Seq de datos crudos fueron descargados e instalados de cada página web que contenía los ficheros de instalación de cada software: a) FastQC 0.11.9 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), utilizado para evaluar el control de calidad de la secuenciación de cada muestra (archivos en formato `.fastq`); y b) Hisat2 2.2.1 (<http://daehwankimlab.github.io/hisat2/>), empleado para el mapeo y ensamblado de las secuencias cortas con respecto a un genoma de referencia.

Para la instalación de Hisat2 2.2.1 se usaron los comandos:

```
sudo apt-get update -y, seguido por el comando: sudo apt-get install  
-y hisat2
```

Para la instalación del programa FastQC 0.11.9 se creó una carpeta en el directorio personal de la PC con el comando:

```
cd enter, seguido por el comando: mkdir opt. Creada la carpeta se accedió  
con el comando: cd opt, y se descargaron los paquetes del programa con el  
comando: wget  
https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/fastqc\_v0.11.9.zip. Posteriormente el archivo fue descomprimido con el  
comando: unzip fastqc_v0.11.9.zip, y el fichero fastqc fue transformado en  
un fichero ejecutable con el comando: chmod +x fastqc_v0.11.9
```

Para continuar con la instalación se editó el fichero `.bashrc` con el editor `nano` utilizando el comando: `nano .bashrc`, escribiendo al final del fichero la notación: `PATH=$PATH:/home/jose/opt/fastQC` (/ruta del ejecutable/). Para finalizar la instalación se ejecutó el fichero `.bashrc` mediante el comando: `source .bashrc`

Los ficheros de la herramienta de `samtools` también se instalaron usando el comando: `sudo apt-get update`, seguido por el comando: `sudo apt install samtools`

El análisis de RNASeq requiere utilizar un genoma de referencia y la anotación de dicho genoma, por lo que se descargaron el genoma de referencia del *Homo sapiens* (Versión 36 (GRCh38.p13) y su anotación, en formato `.fasta` y `.gtf`, respectivamente (<https://www.encodegenes.org/human/>), y los archivos que correspondían a los experimentos de secuenciación (en formato `.fastq`) fueron descargados de la página <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>

El gen de la latrofilina-1 se localiza en el cromosoma 19, por lo que se extrajeron la secuencia y la anotación del mismo de los archivos que contenían la secuencia del genoma de referencia y la anotación del genoma de referencia creando nuevos ficheros (`chr_19.fa` y `chr_19.gtf`)

Una vez instaladas las herramientas utilizadas para el análisis de RNASeq, se procedió a dicho análisis que se basa en 5 pasos fundamentales:

1. Preparación del espacio de trabajo.
2. Análisis de la calidad de las lecturas.
3. Mapeo de las lecturas cortas al genoma de referencia.
4. Ensamblado de los transcritos.
5. Estimación de los niveles de la expresión de cada gen y de cada transcrito.

Este último paso fue omitido.

La preparación del espacio de trabajo se realizó en el escritorio de la PC creando una carpeta genérica (RNAseq), dentro de la cual se crearon las siguientes subcarpetas: “Anotación” (donde se colocó el archivo de la anotación del genoma

de referencia en formato `.gtf`); “Genoma” (carpeta donde se colocó el archivo de las secuencia del genoma de referencia en formato `.fasta`, y el índice del genoma de referencia); “Muestras”, en la que se crearon dos subcarpetas (Muestra1 y Muestra2), cada una conteniendo las secuencias cortas en formato `.fastq`; “Resultados” (en la se colocaron los resultados del control de calidad de las secuencias cortas usadas en este análisis que también fue la carpeta donde se colocaron el mapeo y el ensamblado de las secuencias cortas).

Para la construcción del índice del genoma de referencia se accedió a la carpeta “Anotación” con el comando: `cd Escritorio/RNAseq/Anotación`. Dentro de la carpeta se utilizó el comando: `hisat2_extract_splice_sites.py chr_19.gtf > chr_19.ss`, y posteriormente el comando: `hisat2_extract_exons.py chr_19.gtf > chr_19.exon` para extraer los sitios de *splicing* y los exones. La información fue almacenada en un fichero diferente (`chr_19.ss` y `chr_19.exon`).

Finalmente, se accedió a la carpeta “Genoma” con el comando: `cd ../Genoma` y se aplicó la línea de comando: `hisat2-build --ss ../Anotación/chr_19.ss --exon ../Anotación/chr_19.exon chr_19.fa INDEX` (nombre del índice).

El siguiente paso fue realizar el control de calidad de las secuencias cortas (archivos en formato `.fastq`), y para ello se accedió a la carpeta “Muestras” mediante el comando: `cd Escritorio/RNAseq/Muestra/Muestra1`. Una vez en esta esta carpeta se utilizó el comando: `fastqc ERR3196920_1.fastq.gz` (nombre del fichero).

El mapeo y el ensamblado de los transcriptos o de las secuencias cortas en el genoma de referencia fue realizado accediendo a la carpeta “Genoma” con el comando: `cd Escritorio/RNAseq/Genoma`, y una vez en la carpeta se utilizó el comando: `hisat2 --dta -x ../../Genoma/INDEX -U ERR3196920_1.fastq.gz -S ERR3196920_1.sam >`

alignment_muestra1.txt, que generó un archivo de mapeo de secuencias en formato .sam

Dado que los archivos .sam (sequence alignment map) son muy grandes y utilizan un espacio significativo de memoria de trabajo de la PC, los archivos se transformaron al formato .bam (binary alignment map) mediante el comando: `samtools sort -o ERR3196920_1.bam ERR3196920_1.sam` y el fichero .sam fue posteriormente eliminado con el comando: `rm ERR3196920_1.sam`.

Finalmente, se generó un índice del mapa de alineamiento binario en formato .bam.bai (mapeo y ensamblaje de las secuencias cortas) con el comando: `samtools index ERR3196920_1.bam.bai` y se visualizó en el programa IGV_LINUX 2.8.13 (<https://software.broadinstitute.org/software/igv/download>). En el programa IGV_LINUX 2.8.13 se cargaron la secuencia del genoma de referencia y su anotación, así como el archivo .bam, identificado cada uno de estos archivos.

Resultados

En los análisis de alineamiento múltiple se detectó que en *M. mulatta* (macaco Rhesus) se expresa el intrón 21 de la latrofilina-1 que corresponde al inserto de 45 aa en el extremo citoplasmático de la proteína, producto del proceso de retención intrónica. El macaco Rhesus es un ancestro común del humano y el chimpancé, por lo que se hipotetiza que el intrón que codifica el inserto de 45 aa en la latrofilina-1 también se expresaría en el genoma del humano, pero que no ha sido reportado.

Para evaluar la expresión en el humano del intrón 21 de la latrofilina-1 se realizó un alineamiento de comparación múltiple con la herramienta bioinformática BLASTn de la base de datos NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La secuencia del intrón 21 (NC_000019.10: 14152614-14152783) se obtuvo de la misma base de datos (www.ncbi.nlm.nih.gov) y fue comparada con las secuencias EST reportadas

en la base de datos dbEST (transcriptos maduros), sin encontrar la secuencia del intrón 21 de la latrofilina-1.

Por otra parte, también se realizó un análisis de RNAseq de datos crudos con el objetivo de evaluar la expresión del intrón 21 de la latrofilina-1 humana; para ello, se descargaron archivos de RNAseq (.fastq) que corresponden a dos experimentos de secuenciación de tejido de cerebro humano congelado. El mapeo y el ensamblado de las secuencias cortas de los RNASeq indicaron que el intrón 21 de la latrofilina-1 está presente de forma parcial en la secuencia traducida de la proteína, ya que se detectaron transcritos que corresponden a la secuencia parcial del intrón 21 en ambas muestras (ver Figura 1A), lo que sugiere que el intrón 21 de la latrofilina-1 de humano se retiene de forma parcial (ver Figuras 1 y 2).

A

```

VSDRDDQVSSLRKTPEGGWPKDPLTFGLCSQ
VSSLRKTPEGGWPKDPLTFGLCSQ
GLA*VSDRDDQ
DPLTFGLCSQ

```

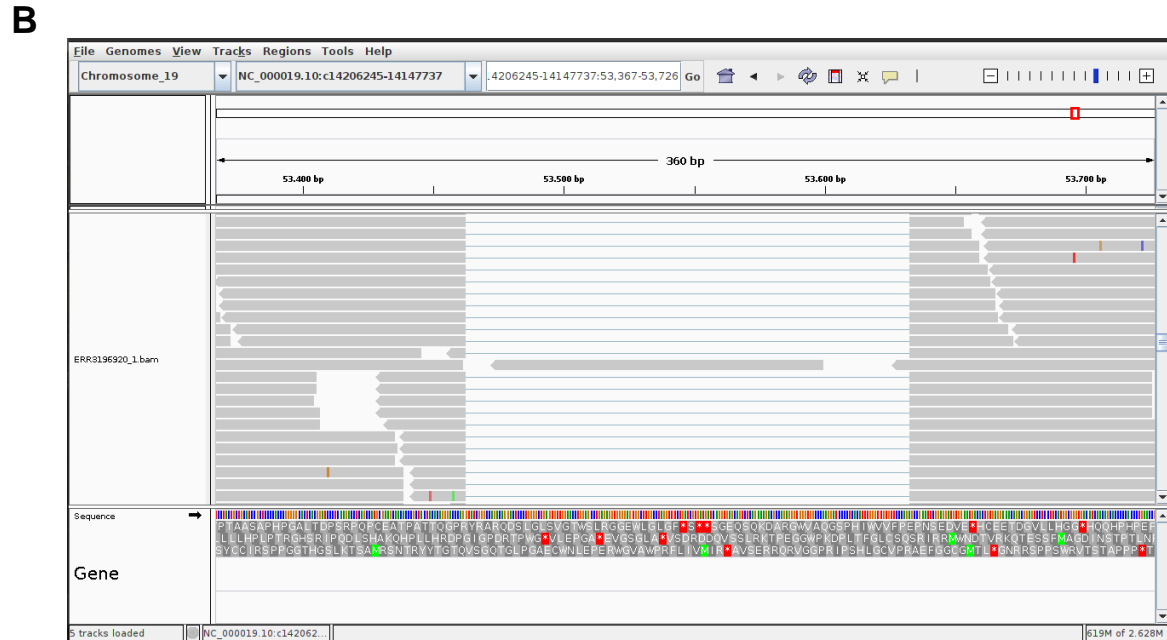


Figura 1. Detección de transcritos en la región génica que corresponde al intrón 21 de la latrofilina-1 humana. A. Las secuencias de amino ácidos corresponden de forma parcial a lecturas cortas detectadas del intrón 21 de la latrofilina-1 humana. **B.** El mapeo y ensamblado correspondiente a la muestra 1 indica la detección de transcritos en el intrón 21 de la latrofilina-1 humana.

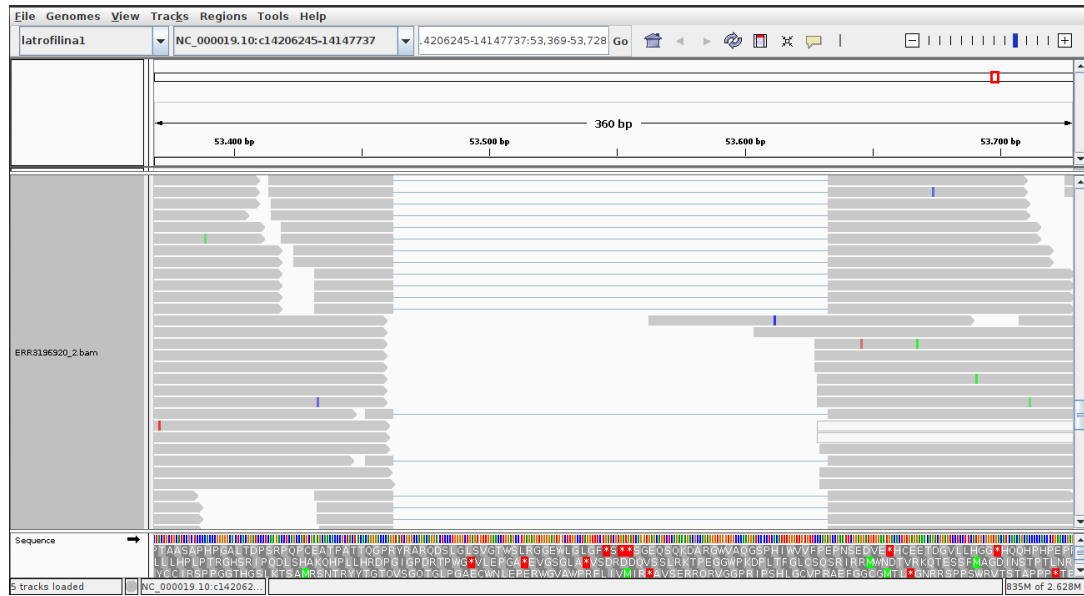
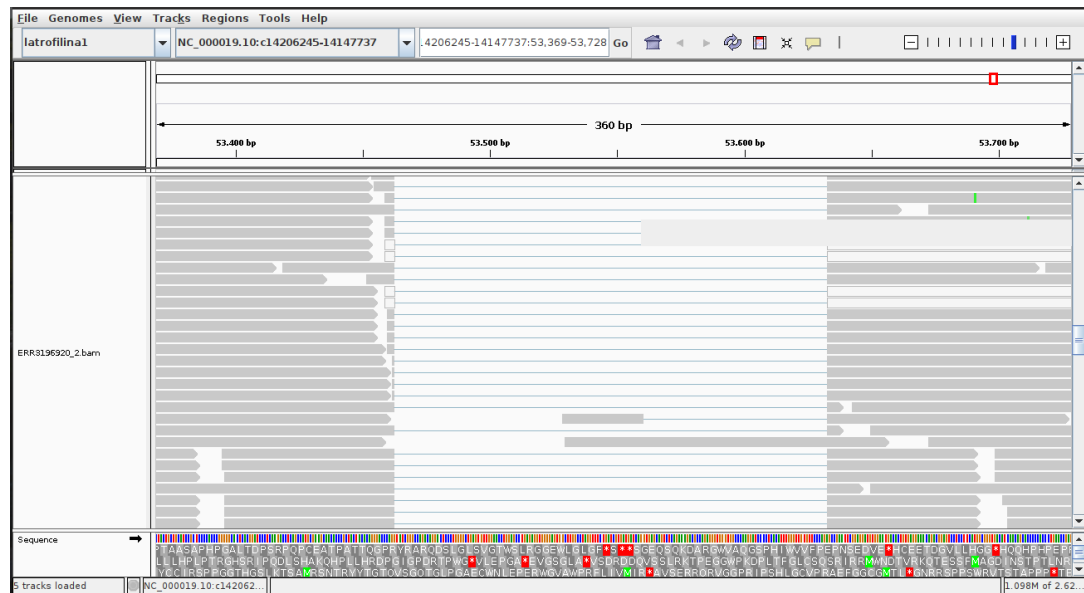
A**B**

Figura 2. Detección de transcritos en la región génica que corresponde al intrón 21 de la Iatrofilina-1 humana. A y B. El mapeo y ensamblado correspondiente a la muestra 2 indica la detección de transcritos en el intrón 21 de la Iatrofilina-1 humana.