



Universidad
Zaragoza



Instituto Universitario de Investigación
Biocomputación y Física
de Sistemas Complejos
Universidad Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Estudios de GPCR huérfanos del sistema nervioso central

Research on orphan GPCRs from the central nervous system

Alumna: Iris del Val García

Director 1: Javier García Nafría

Director 2: José Alberto Carrodegua Villar

**Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas
complejos (BIFI)**

Grado en Biotecnología

Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza

Curso 2020/2021



RESUMEN

Los receptores GPR3, GPR6 y GPR12 son receptores acoplados a proteínas G (GPCR) huérfanos con amplia distribución en el sistema nervioso central. Estos receptores están involucrados en la formación de neuritas, son posibles dianas de fármacos contra enfermedades neurodegenerativas y no hay ligando endógeno conocido que los active. Aunque son receptores con alta relevancia fisiológica y terapéutica, su función y localización subcelular no está clara. Se ha propuesto que estos receptores presentan actividad constitutiva, aunque en los ensayos descritos no se puede descartar la presencia de un posible agonista ubicuo desconocido; además, se desconocen los mecanismos de activación constitutivos y existe controversia sobre su posible acoplamiento dual tanto con proteína G_s como $G_{i/o}$. En este trabajo se determina que los receptores GPR3, 6 y 12 se localizan predominantemente en el interior celular, visto en células de insecto, células HEK293T y en líneas de neuroblastoma (SH-SY5Y), utilizando ensayos de biotinización de superficie y microscopía de fluorescencia. Además, se demuestra que los receptores son constitutivamente activos y que pueden acoplarse a ambas proteínas G_s y $G_{i/o}$. Esto se consigue monitorizando el acoplamiento de proteínas G quiméricas (MiniG_s399 y MiniG_o12) por microscopía de fluorescencia en células, así como en ensayos *in vitro* de unión de proteínas (GFP-TS). Estos resultados se distinguen de los ya reportados en que no están basados en niveles de AMPc y reportan un caso infrecuente de receptores capaces de acoplar ambos tipos de proteínas G. Finalmente, se han generado variantes de GPR12 (15 de los 30 constructos generados en este trabajo) con el fin de aumentar la expresión en células de insecto, identificando regiones del receptor esenciales para la expresión y consiguiendo generar un baculovirus que expresa cantidades significativas de GPR3 funcional. Esto abre el camino a entender el mecanismo de activación constitutiva mediante determinación estructural por crio-microscopía electrónica.

Palabras clave: GPCR, receptor huérfano, actividad constitutiva, acoplamiento dual, G_s , $G_{i/o}$.

ABSTRACT

GPR3, GPR6 and GPR12 are orphan G-protein coupled receptors (GPCRs) with wide distribution in the central nervous system. These receptors are involved in the formation of neurites, are potential drug targets to treat neurodegenerative diseases and have no endogenous ligand known to activate them. Even though they are receptors with high physiological and therapeutic value, their function and subcellular location is unclear. These receptors have been proposed to present constitutive activity, although the presence of a possible unknown ubiquitous agonist cannot be dismissed in the assays described; moreover, the constitutive activation mechanisms are unknown and there is controversy about their possible dual coupling with both G_S and $G_{i/O}$ proteins. In this work, it is determined that the GPR3, 6 and 12 receptors are predominantly located inside the cell, seen in insect cells, HEK293T cells and in neuroblastoma lines (SH-SY5Y), using surface biotinylation assays and fluorescence microscopy. Furthermore, it is demonstrated that the receptors are constitutively active and that they can couple to both G_S and $G_{i/O}$ proteins. This is achieved by monitoring the coupling of chimeric G proteins (Mini G_S 399 and Mini G_O 12) by fluorescence microscopy in cells, as well as *in vitro* protein binding assays (GFP-TS). These results differ from those already reported in that they are not based on cAMP levels and report an uncommon case of receptors capable of coupling both types of G proteins. Finally, a set of GPR12 variants have been obtained (15 of the 30 constructs generated in this work) in order to increase receptor expression in insect cells, identifying essential receptor regions for expression and managing to generate a baculovirus that expresses significant amounts of functional GPR3 in a functional way. This opens the way to understand the mechanism of constitutive activation by means of structural determination by cryo-electron microscopy.

Keywords: GPCR, orphan receptor, constitutive activity, dual coupling, G_S , $G_{i/O}$.

Índice del TFG

1. Introducción	página 1
2. Objetivos	página 2
3. Materiales y métodos	página 3
3.1. Clonaje de genes	página 3
3.1.1. IVA clonning (<i>In Vivo Assembly cloning</i>)	página 3
3.1.2. Corte y empalme por enzimas de restricción	página 4
3.1.3. Confirmación de clones positivos	página 4
3.2. Cultivos celulares	página 5
3.2.1. Mantenimiento de líneas celulares	página 5
3.2.2. Transfección transitoria para expresión de receptores en células de insecto (<i>Thi</i>) y de mamífero (HEK293T, SH-SY5Y)	página 5
3.2.3. Generación de baculovirus e infección de células de insecto	página 5
3.3. Estudios biofísicos y bioquímicos	página 6
3.3.1. Solubilización de receptores para estudios bioquímicos y biofísicos	página 6
3.3.2. Electrotransferencia e inmunodetección por Western-blot	página 6
3.3.3. Curvas de termoestabilidad	página 6
3.3.4. Pull-down de afinidad de metal (IMAC)	página 7
3.3.5. Ensayos de biotinilización de receptores de superficie	página 7
4. Resultados	página 8
4.1. Expresión, localización subcelular y funcionalidad de los receptores GPR3, 6 y 12	página 8
4.2. Análisis de actividad constitutiva de receptores huérfanos	página 11
4.3. Optimización de producción de GPR3, 6 y 12 para estudios de estructura-función	página 13
5. Discusión	página 19
6. Perspectivas futuras	página 20
7. Conclusión	página 21
8. Bibliografía	página 22
9. Anexos	página 25

1. INTRODUCCIÓN:

Los receptores acoplados a proteína G (GPCR) son la más extensa familia de receptores celulares humanos (>800 miembros) y actúan como excelentes dianas terapéuticas (34% de los fármacos aprobados actúan sobre los GPCR (1)). Los GPCR no son solo diana de neurotransmisores clásicos del sistema nervioso central (dopamina o serotonina, por ejemplo), sino también de fármacos para el tratamiento de enfermedades neurológicas tales como la esquizofrenia o el Parkinson (2). Respecto a su función, transducen la información derivada de estímulos extracelulares hacia el interior celular activando heterotrímeros de proteínas $G\alpha\beta\gamma$ (3), aunque es la subunidad $G\alpha$ la que determina la unión y especificidad a cada GPCR. Los GPCR se pueden acoplar a cuatro familias de proteínas G distintas (G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ y $G_{12/13}$), cada una activando rutas de señalización diferentes. Entre la gran variedad de GPCR humanos, todavía quedan ~70 para los que no se ha identificado su ligando endógeno; se clasifican como GPCR huérfanos ("orphan GPCRs", oGPCRs). Dado el alto impacto de los GPCR en la clínica, el estudio de receptores huérfanos tiene un alto potencial para abrir nuevas rutas para terapéutica.

Los **receptores GPR3, GPR6 y GPR12** comprenden una de estas familias de **receptores huérfanos** y se expresan predominantemente en el sistema nervioso central (4–6) (Fig. 1). Esta familia participa en el crecimiento de neuritas (7) y tiene una alta implicación en la enfermedad del Alzheimer (EA) ya que los tres receptores se han visto asociados con la formación de placas amiloides, un sello de las enfermedades neurodegenerativas. Las placas amiloides están formadas por proteína β -amiloide ($A\beta$) que se origina a partir de la escisión de APP (*Amyloid- β precursor protein*) mediada por la enzima γ -secretasa. Se ha demostrado que el GPR3 aumenta la actividad de la γ -secretasa y su localización en la superficie celular mediante la activación de la arrestina2, que interacciona con la γ -secretasa (8,9). Adicionalmente, GPR3 está sobre-expresado en pacientes con enfermedad de Alzheimer mientras que ratones modelo de Alzheimer knock-out para GPR3 presentan una reducida formación de placas amiloides y mejora de memoria (10). Por otro lado, el GPR6 está regulado al alza en la EA por el factor de transcripción C1q, participando en la vía clásica del complemento, que se ha asociado con la supervivencia neuronal ya que bloquea la neurotoxicidad fibrilar β -amiloide (11). Finalmente, GPR3, 6 y 12 pueden desempeñar un papel clave en la neuroprotección en personas con EA o Parkinson, así como en otras muchas patologías tales como la infertilidad, la obesidad o la metástasis del cáncer (12). Por ello, el estudio de estos receptores huérfanos es fundamental para el desarrollo de métodos diagnósticos o poder usarlos como dianas terapéuticas.

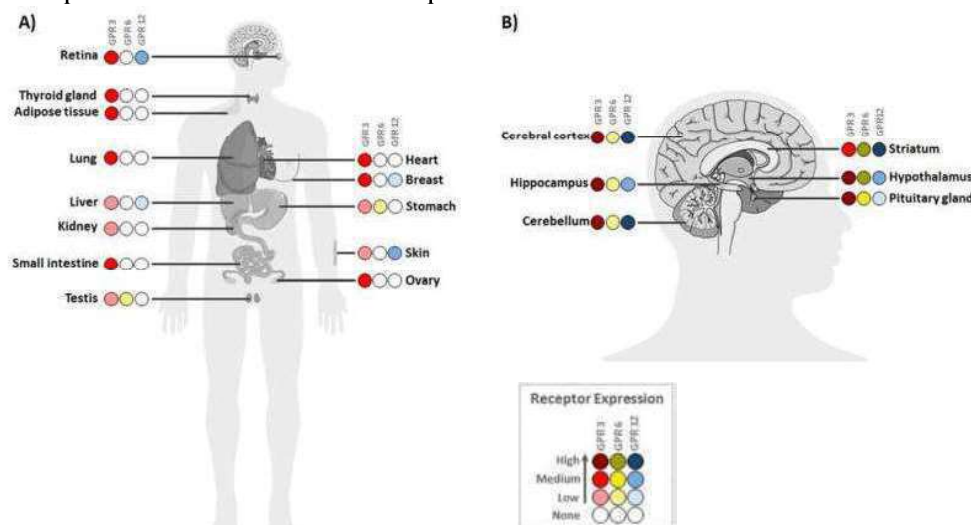


Figura 1. Representación esquemática de la expresión de GPR3, GPR6 y GPR12 en A) la periferia y en B) el SNC. Leyenda de colores: GPR3 en rojo, GPR6 en verde, GPR12 en azul; colores oscuros representan mayor expresión, mientras que los claros menor expresión (Morales P y col. 2018) (15).

Aunque los GPR3, 6 y 12 son receptores huérfanos, comparten homología de secuencia con los receptores de esfingosina-1-fosfato (S1P) y con otros receptores de lípidos, como los receptores cannabinoides o de melanocortina (13). Por ello, basados en ensayos experimentales, se han propuesto los esfingolípidos S1P (14), la dihidroesfingosina-1-fosfato (DHS1P) y la esfingosilfosforil colina (SPC) (15) como ligandos endógenos para esta familia. No obstante, los datos farmacológicos son controvertidos ya que estudios posteriores negaron la activación de los receptores por S1P (16). Por lo tanto, hasta la fecha **no se ha confirmado ningún ligando endógeno** para GPR3, 6 y 12 y todavía se clasifican como receptores huérfanos.

En cuanto a la localización celular, los GPCR suelen localizarse en la membrana plasmática. No obstante, se ha publicado que GPR6 está predominantemente en los compartimentos intracelulares (17) y que podría señalizar desde el interior de la célula. Para el caso de GPR3 y GPR12, hay estudios que también los sitúan en el interior celular (18) y en el exterior celular (19), en cambio los resultados todavía no son concluyentes ni se ha reportado nada sobre la transducción de señal en compartimentos intracelulares. **Por lo tanto, no está establecida la localización sub-celular de estos receptores.**

Una de las propuestas es que los GPR3, 6 y 12 son **constitutivamente activos** y que unen y activan proteínas G sin requerir ligandos endógenos. Por una parte ensayos de medición de AMPc (20) demostraron que GPR3 era capaz de activar la adenilato ciclasa a un nivel similar al obtenido con otros GPCR que están completamente estimulados por sus ligandos. Esto fue confirmado por Eggerickx y col. (1995) y más adelante por Bresnick y col. (21) y Martin y col. (22) incluyendo también el GPR6 y 12. Los resultados obtenidos indican que estos receptores huérfanos presentan acoplamiento constitutivo con la proteína G_s , no obstante, como ya se ha planteado, **esa actividad constitutiva se podría deber a la estimulación por un ligando ubicuo desconocido**. Además, se ha propuesto que estos receptores activan tanto a proteínas G de tipo G_{α_s} como de tipo $G_{\alpha_{i/o}}$. Esto es interesante ya que las proteínas G_{α_s} tienen una actividad contraria a las de tipo $G_{\alpha_{i/o}}$ (activan o inhiben la formación de AMPc intracelular, respectivamente). Por ello existe controversia y otros grupos de investigación han obtenido resultados contradictorios (12). Uhlenbrock et al. (14) concluyó que GPR3, 6 y 12 activan $G_{i/o}$ constitutivamente; sin embargo, Martin y col. (22) demostraron la actividad constitutiva para $G_{i/o}$ de los receptores GPR6 y 12, pero no para GPR3, lo que contradice el estudio anterior. **Por lo tanto, no se puede confirmar que los receptores sean constitutivamente activos ni se está seguro de que activen proteínas G de tipo $G_{i/o}$.**

2. OBJETIVOS:

El proyecto tiene como objetivo general la caracterización molecular de los receptores GPR3, 6 y 12. Dentro del proyecto se realizaron los siguientes objetivos:

- **Objetivo 1. Caracterizar la expresión, localización subcelular y funcionalidad de los receptores GPR3, 6 y 12.** Se usará microscopía de fluorescencia con diferentes líneas celulares de insecto (*Thi* y *Sf9*) y de mamíferos (HEK293T y SH-SY5Y, esta última línea celular derivada de humanos aislada de una biopsia de médula ósea con neuroblastoma), así como ensayos de biotinización de receptores de superficie.
- **Objetivo 2. Determinar si los receptores GPR3, 6 y 12 tienen actividad constitutiva.** Se usarán variantes de proteínas G dominantes negativas (MiniGs) que se unen de manera estable a los receptores en estado activo, y se determinará su unión con ensayos biofísicos *in vitro* y con ensayos celulares y microscopía de fluorescencia. Estos ensayos medirán la actividad constitutiva midiendo directamente la unión de proteínas G, lo que es más fiable que cuantificar eventos más abajo en la cascada de señalización y, en los ensayos *in vitro*, se reduce la posibilidad de que esté presente un ligando endógeno.

- **Objetivo 3. Determinar la capacidad de unión de los receptores GPR3, 6 y 12 a proteínas G_s y G_{i/o}.** Se usarán ensayos con MiniGs para determinar la unión de proteínas G_s y G_{i/o} a los receptores tanto *in vitro* con receptor solubilizado en detergente como en ensayos celulares. Al igual que el Objetivo 2, estos experimentos tienen la ventaja de determinar el acoplamiento de proteínas G directamente al receptor.
- **Objetivo 4. Comenzar los estudios de estructura-función.** Uno de los objetivos del proyecto a largo plazo es entender el mecanismo estructural de actividad constitutiva de los receptores GPR3, 6 y 12. Para ello se busca atrapar el estado activo de los receptores en un complejo con proteínas G para su determinación estructural por microscopía electrónica de alta resolución. Para ello, se requiere producir grandes cantidades de receptor funcional y puro. Por lo tanto, se procederá a realizar mutagénesis dirigida y deleciones en la estructura de uno de los tres receptores para tratar de mejorar la expresión y el tráfico, así como para analizar la relevancia funcional de las distintas partes de su estructura. Una vez se vea expresión se procederá a la creación de un baculovirus que exprese grandes cantidades de receptor funcional en células de insecto, que se utilizará después para purificar el receptor a gran escala.

Impacto: los resultados describirán nuevos mecanismos de función de los GPCR y sentarán las bases para descubrir nuevos neurotransmisores, así como para desarrollar nuevos fármacos para tratar enfermedades del sistema nervioso central.

3. MATERIALES Y MÉTODOS:

3.1. CLONAJE DE GENES:

3.1.1. IVA cloning (*In Vivo Assembly cloning*): se utilizó este método para la mayoría de los clonajes de genes, que está basado en el ensamblaje *in vivo* de fragmentos de DNA previamente amplificados por PCR (Fig. 2). Dicho ensamblaje está guiado por regiones flanqueantes homólogas cortas que se fusionan mediante recombinación en el huésped bacteriano (23,24). Mediante este método realizamos inserciones, deleciones, mutagénesis dirigida y sub-clonaje de genes incluidos en plásmidos. Además, según el diseño de primers, pueden realizarse y combinarse distintas modificaciones a voluntad en el mismo tubo de PCR (23). El protocolo que se siguió es:

1. Diseño del primer o cebador: las regiones homólogas se diseñaron para tener longitudes de 15-20 pb con una T_m de ~47-52°C.
 - Primers para sub-clonaje de genes GPR3, 6 y 12 (*Anexo IV: diseño de primers: 1-8*).
 - Primers para mutagénesis dirigida en GPR12 (*Anexo IV: diseño de primers: 11-12, 23-30*).
 - Primers para inserción en GPR12 (*Anexo IV: diseño de primers: 9-10*).
 - Primers para delección del N- y C-term en GPR12 (*Anexo IV: diseño de primers: 13-22, 31-32*).
 - Primers para delección de GFP en GPR3,6,12 en pCDNA4 (*Anexo IV: diseño de primers: 33-34*).
 - Primers para sub-clonaje de GFP-G_{s/o} en pCDNA4 (*Anexo IV: diseño de primers: 35-37*).
2. Se realizó la PCR (18 ciclos):
 - Hot Start 98°C, 30 segundos
 - Desnaturalización 98°C, 10 segundos
 - Hibridación a la T_m de los oligos (~55°C), 30 segundos
 - Extensión 72°C, 3 minutos
 - Extensión final 72°C, 10 minutos

Componentes
Primers
DNA molde
Tampón (5x)
dNTPs (2,5mM)
Polimerasa (<i>Phusion High-Fidelity</i>)
Betaina
DMSO (2,5%)
H ₂ O MiliQ estéril

Tabla 1. Componentes y cantidades de cada uno a añadir en el protocolo de PCR.

3. Digestión del DNA molde con *DpnI* (endonucleasa específica para DNA metilado): 15 min a 37°C.
4. Ensamblaje de fragmentos de DNA mediante transformación en *E. coli* (*XL10-Gold Ultracompetent cells*): 4µl del producto de PCR en 100µl de células, choque térmico a 42°C 30seg y cultivo a 37°C en medio LB agar + Ampicilina (para la selección).

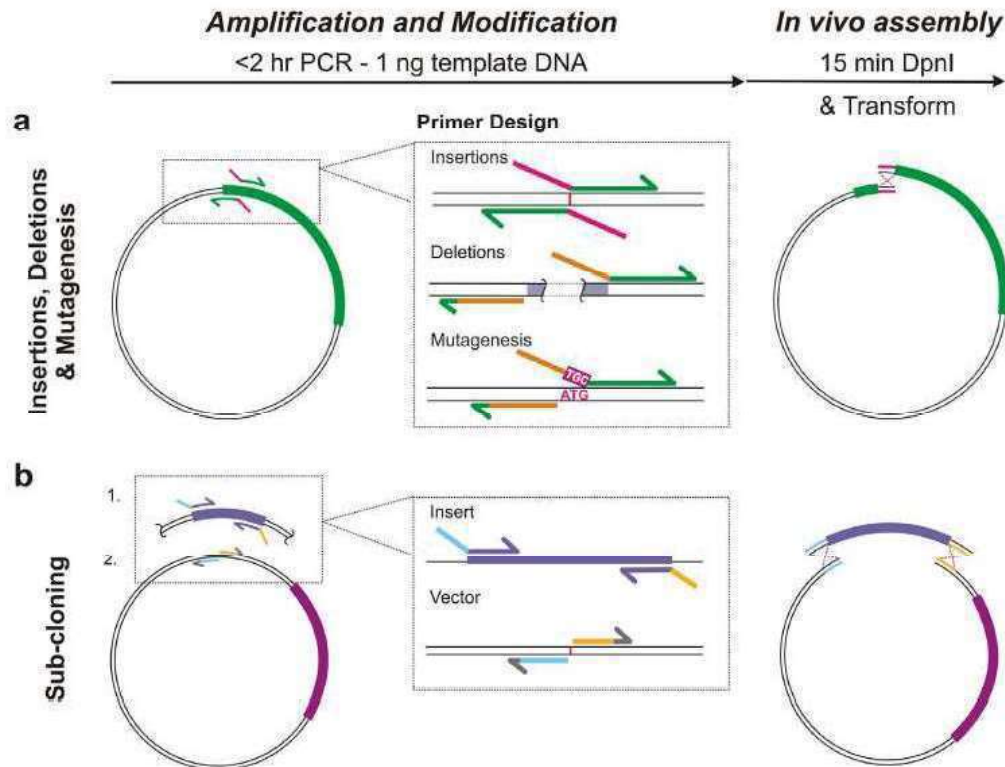


Figura 2. Esquema del procedimiento y diseño del cebador para cada tipo de modificación básica: inserción, deleciones, mutagénesis dirigida y sub-clonaje. En el caso de inserciones, es mejor incluir la secuencia de inserción en la región homóloga de ambos primers: Fw y Rv (región magenta). En el caso de deleciones, la superposición (naranja) se incorpora independientemente en el Fw o Rv. En caso de mutación, se coloca entre la secuencia homóloga y la complementaria. Y en el sub-clonaje se amplifica tanto el vector como el inserto con regiones homólogas (García-Nafría y col. 2016) (23).

3.1.2. Corte y empalme por enzimas de restricción: se utilizó para cambiar los constructos entre vectores. Se usó *BamHI* y *NotI* (cortan dejando extremos cohesivos) (usando fosfatasa alcalina para evitar que recirculice el vector), y se extrajo el DNA de las bandas después de realizar electroforesis en gel de agarosa, para su posterior ligación mediante la enzima ligasa. Los distintos vectores que se usaron son: **pLEX** (*Anexo III*: Fig. 19B) (para expresión transitoria en células de insecto *Tni* y *Sf9*), **pCDNA4** (*Anexo III*: Fig. 19C) (para expresión en células de mamífero HEK293T y SH-SY5Y) y **pBackPak8** (vector lanzadera para generar baculovirus).

3.1.3. Confirmación de clones positivos: una vez que se generó y aisló el constructo por protocolos de miniprep, el clon se confirmó mediante secuenciación de Sanger previa confirmación cortando con enzimas de restricción (*BamHI*, *NotI*, *PstI* y *NdeI*). Los que presentaron el patrón adecuado (*Anexo II*) se enviaron a secuenciar. Entre las enzimas usadas, *BamHI* y *NotI* sirvieron para ver si está el inserto, *PstI* para distinguir los distintos genes y *NdeI* para ver si era vector pCDNA4 o no. pBackPak8 y pLEX se distinguieron por el peso molecular.

3.2. CULTIVOS CELULARES:

3.2.1. Mantenimiento de líneas celulares: Las líneas de células de insecto *Tricoplusia ni* (*Tni*) y *Spodoptera frugiperda* (*Sf9*) se mantuvieron en suspensión a 29°C en 10ml de cultivo a concentraciones de $0,5 \times 10^6$ - 3×10^6 células/ml en medio de cultivo ESF921. Las líneas de mamífero (HEK293T, SH-SY5Y) se mantuvieron en adherente a 37°C y 5% CO₂ en medio DMEM con 10% FBS y antibióticos (penicilina, estreptomicina).

3.2.2. Transfección transitoria para expresión de receptores en células de insecto (*Tni*) y de mamífero (HEK293T, SH-SY5Y): se usaron placas de 6, 12 o 24 pocillos. En el caso de las células de insecto, se añadieron a una concentración de $0,5 \times 10^6$ células/ml en el pocillo (placa de 6 pocillos: 1×10^6 células; de 12 pocillos: 500.000 células; y de 24 pocillos: 250.000 células) y se transfectaron en el mismo día; mientras que las células de mamífero se prepararon el día anterior al de la transfección.

La transfección se realizó con PEI Max con un ratio 1:2 de DNA:PEI (placa de 6 pocillos: 3µg de DNA; de 12 pocillos: 1,5µg de DNA; y de 24 pocillos: 0,5µg). La polietilenimina (PEI) es un polímero catiónico necesario para la transfección de DNA, por lo que forma complejos con el DNA para cargarlo positivamente. En el caso de células de mamífero, la mezcla de DNA:PEI se preparó en DMEM sin FBS ya que el FBS inhibe la transfección.

La co-transfección de MiniG y receptores se realizó en placas de 24 pocillos con ratio 1:2 de DNA:PEI y ratio 1:3 de MiniG:receptor (1µg de PEI, 375ng de receptor y 125ng de MiniG).

3.2.3. Generación de baculovirus e infección de células de insecto: se utilizaron células de insecto *Sf9* o *Tni* para la expresión de receptores humanos. Para generar baculovirus recombinante se utilizó el sistema flashBAC™. Se transfectaron células *Sf9* con DNA flashBAC™, el reactivo de transfección Cellfectin® (formulación de lípidos-catiónicos diseñada para producir una transfección óptima, uniforme y eficaz de células de insecto como *Sf9* (25)) y el plásmido con el gen de interés clonado en el vector lanzadera pBackPak8 (26). En el plásmido pBackPak8, el constructo está flanqueado por el **promotor de la polihedrina** y la **secuencia de terminación** para su correcta expresión en células de insecto. Esto estará flanqueado por regiones de recombinación del genoma del baculovirus (DNA lineal flashBAC). Se suelen usar **secuencias del gen de la polihedrina** (ORF603, ORF1629), ya que nos interesa eliminarla porque no queremos que se formen los poliedros del virus que producen la lisis, sino que la célula tarde más en morir y se produzca más proteína. Tras la transfección en células de insecto, se produce la recombinación homóloga entre estas zonas idénticas en el vector y en el genoma. Esto hace que se interrumpa el gen de la polihedrina del genoma y se acabe perdiendo; y a la vez se restaura la función de ORF1629 permitiendo que el DNA viral se replique y produzca partículas de virus (26).

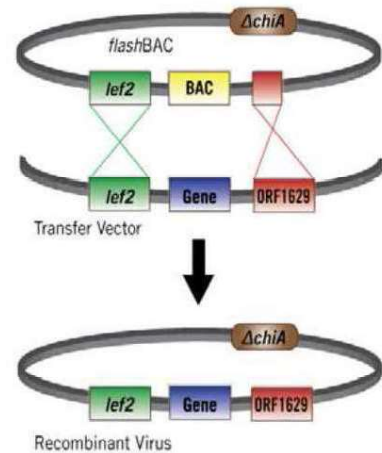


Figura 3. Recombinación homóloga entre ORF603 y ORF1629 del plásmido pBackPak8 con el genoma del baculovirus (Mirus) (26).

Tras 5 días en los que el genoma del virus recombinante se ha ido replicando en las células transfectadas *Sf9*, se recogió el sobrenadante (Pase 1 (P1)). Este virus recombinante tendrá dentro el inserto que nos interesa, por lo que se infectó un nuevo cultivo de células para amplificar el virus durante un P2 y un P3 (las *Sf9* se infectaron a 1-2 millones de células/ml, cinco días de incubación cada uno), que es lo que finalmente se usó para infectar y producir proteína.

Generalmente, las células *Sf9* se utilizan para amplificar el virus, mientras que las células *Thi* se utilizan para la producción de proteínas (26). La producción de proteínas se realiza infectando las células de insecto en fase de crecimiento exponencial (alrededor de 2-3 millones/ml) y se infecta con 3-5% del correspondiente virus en pase P3. La expresión se realiza durante 48h a 29°C.

3.3. ESTUDIOS BIOFÍSICOS Y BIOQUÍMICOS:

3.3.1. Solubilización de receptores para estudios bioquímicos y biofísicos: se partió de un pellet de células, bien generado por infección por baculovirus o por transfección transitoria. Se resuspendieron las células en 25mM de Tris HCl pH7,4, 150mM NaCl, inhibidores de proteasas y 1% detergente (DDM o LMNG). Se solubilizó con agitación a 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante se clarificó por centrifugación durante 10 minutos a 4.000 rpm en una centrífuga de mesa.

3.3.2. Electrotransferencia e inmunodetección por Western-blot: para la transferencia se usó un sistema semiseco de transferencia a una membrana de nitrocelulosa. Una vez transferido se bloqueó la membrana durante 5min con EveryBlotBlocking Buffer (buffer comercial), y se incubó con un anticuerpo conjugado dirigido contra la cola de histidinas (anti-His) durante 1h a temperatura ambiente (u o/n a 4°C). El anticuerpo está conjugado con una enzima reporter (HRP, “horseradish peroxidase” o peroxidasa de rábano) que cataliza una reacción de oxidación utilizando peróxido de hidrógeno como agente oxidante (27). La membrana se lavó 3 x 5 min con TBS + Tween (rompe las interacciones débiles que pueda haber con la membrana) y se reveló con el sustrato Clarity Western ECL Substrate, sustratos de HRP que producen un cambio de color detectable por métodos espectrofotómetros.

3.3.3. Curvas de termoestabilidad: determinación de la T_m de los receptores libres y unidos a proteína G.

Se hizo uso de un ensayo de desplazamiento térmico simple (también llamado “Thermal Shift Assay”). Consiste en la detección de la fluorescencia intrínseca de la proteína reporter de fusión (proteína fluorescente verde o GFP) en un barrido de temperaturas (**GFP-TS**) (28). El receptor solubilizado con una GFP de fusión se alícuota y calienta a diferentes temperaturas (4°C-100°C) para luego eliminar la fracción que agrega mediante centrifugación. La fluorescencia remanente en el sobrenadante nos informará de la fracción de la proteína en estado plegado. Estos datos se ajustan a una curva de despliegue térmico, cuyo punto de inflexión nos da la T_m (temperatura a la que la mitad de la proteína está desplegada) (Fig. 4). Mediante esta técnica se puede calcular la estabilidad de un receptor así como detectar interacciones proteína-ligando o proteína-proteína ya que la unión proteínas/ligando al receptor plegado y funcional altera su estabilidad y, por ende, se puede observar una modificación de la T_m (28,29).

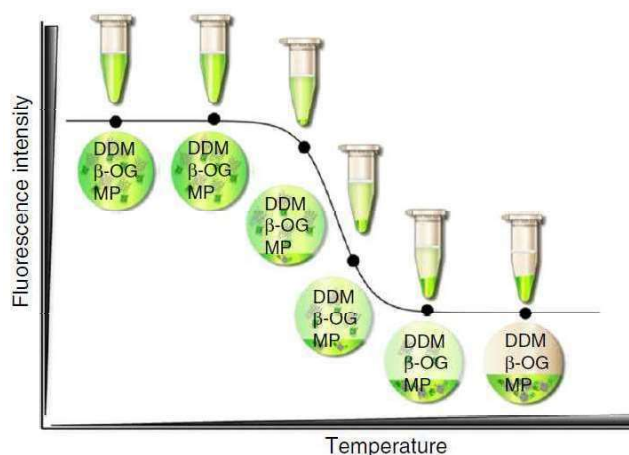


Figura 4. Representación esquemática del ensayo GFP-TS (Njiy col. 2018) (28).

Estos ensayos se realizaron solubilizando el receptor fusionado a GFP (Consultar *Materiales y métodos: Estudios biofísicos y bioquímicos: Solubilización de receptores para estudios bioquímicos y biofísicos*) e incubándolo en presencia/ausencia de proteína G durante 30min a 4°C. Cabe señalar que en estos

ensayos se utilizaron proteínas G obtenidas por ingeniería genética formadas únicamente por la correspondiente subunidad $G\alpha$ con capacidad de bloquear el receptor en el estado activo y quedarse unida. Estas proteínas no tienen capacidad de unirse a la subunidad $G\beta\gamma$ y se denominan proteína MiniG_s399 y MiniG_o12 (el número hace referencia al número del mutante que se ensayó) (30,31).

Posteriormente, se repartió la disolución en distintas alícuotas que se incubaron a 4°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C y 100°C durante 10min y se midió la fluorescencia de la GFP en el sobrenadante después de centrifugar durante 10 minutos a 4.000 rpm en una centrífuga de mesa. Estos valores de fluorescencia se usaron para ajustar una curva sigmoidea usando GraphPad Prism, cuyo punto de inflexión corresponde con la temperatura de fusión o T_m de la proteína.

3.3.4. Pull-down de afinidad de metal (IMAC): purificación de proteínas recombinantes totales marcadas con histidina mediante micropartículas de resina TALON[®]. Se realizó la solubilización de los receptores con cola de histidinas (buffer de solubilización con 1% de DDM) y se incubó con la resina 30min a 4°C. Las columnas TALON[®] presentan un medio basado en cobalto, lo que permite purificar proteínas marcadas con histidina, ya sea en condiciones nativas o desnaturalizadas (32,33). Una vez unidas se recoge el sobrenadante (FT=flow-through, lo que no se ha unido a la resina) después de centrifugar y se realizan tres lavados con el mismo buffer, pero con 0,03% de DDM, para eliminar aquellas partículas que habían establecido uniones inespecíficas (W=wash). La elución se realiza con un buffer de solubilización, pero con 0,03% de DDM y 500mM de imidazol (E=elution). El imidazol es un análogo de la histidina, de manera que compite con las histidinas por el ion metálico, se une a la columna de afinidad y las desplaza de forma progresiva (34). Las distintas fracciones se analizaron mediante gel SDS-PAGE y Western-blot usando anticuerpos anti-His conjugados a HRP.

3.3.5. Ensayos de biotilización de receptores de superficie: se transfectaron los receptores transitoriamente en células HEK293T, después de 48h se incubaron con buffer 25mM HEPES y 150mM NaCl con 0,5mg/ml de Sulf-NH-SS-Biotin y se deja en movimiento 30min. La Sulf-NH-SS-Biotin es un compuesto que se une a los grupos NH_4^+ de las lisinas, y que no atraviesa la membrana celular, marcando así solo los receptores presentes en la superficie celular (35). Cabe advertir que en la superficie extracelular de estos receptores huérfanos hay lisinas (Fig. 11). Posteriormente, se hicieron tres lavados con 50mM Tris pH8 y 150mM NaCl para terminar la reacción (el Tris presenta grupos NH_4^+ de manera que inactiva biotina remanente). Después se aislaron las células por centrifugación y el receptor se solubilizó (en agitación durante 30 min a 4°C en 25mM Tris HCl pH7,4, 150mM NaCl, 1% DDM e inhibidores de proteasas). El receptor soluble se clarificó por centrifugación, se reservaron 25 μ l del sobrenadante (L=load o proteína total) y el resto se incubó con una resina de estreptavidina durante 30min a 4°C. Esta resina presenta una alta afinidad por la biotina, por lo que el receptor marcado con biotina quedará unido. De la misma manera que en el pull-down por IMAC (en este caso se separa el sobrenadante con un imán) se consiguen el sobrenadante (FT) y lavado (buffer con DDM reducido al 0,05% (W)). Para separar el receptor de la biotina se eluyó con DTT (100mM, buffer de carga de SDS-PAGE), que rompe los puentes disulfuro entre el receptor y la biotina (E=elution). Las fracciones obtenidas se analizaron mediante gel de poliacrilamida SDS-PAGE, fluorescencia en gel y por Western-blot usando anticuerpos anti-His conjugados a HRP.

4. RESULTADOS:

4.1. EXPRESIÓN, LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y FUNCIONALIDAD DE LOS RECEPTORES GPR3, 6 Y 12.

Los receptores GPR3, 6 y 12 humanos nativos se consiguieron como hebras de DNA sintéticas lineales de doble hélice y se clonaron en el vector pIEX dejando una HASS en el N-terminal y una GFP-10xHis fusionada en el C-terminal mediante un linker formado por 3xGGGS y un sitio de corte TEV (Fig. 5).



Figura 5. Representación esquemática del constructo común que se va a clonar en distintos vectores de expresión. HASS: HA signal sequence; GPR3, 6, 12: gen de interés; 3xGGGS: linker; TEV site: sitio de corte de la proteasa; GFP: proteína fluorescente verde; 10xHis: cola de histidinas.

La expresión de estos receptores (clonados en el vector pIEX) transfectados transitoriamente en células de insecto *Thi* mostraron una buena expresión con distribución probable en el interior celular, monitorizado mediante microscopía de fluorescencia (Fig. 6a-c). Se observa que el GPR3 y 12 tienen una distribución más homogénea mientras que en el GPR6 se visualizan algunos gránulos en el interior celular (círculos rojos en la Fig. 6b). Esto podría indicar que el receptor forma agregados no funcionales o bien que está en compartimentos intracelulares. Esto último podría ser debido a que el receptor sea constitutivamente activo y por eso se desensibiliza reclutándose al interior celular mediante la arrestina, sin embargo, se ha visto que los receptores GPCR humanos no activan proteínas G de células de insecto (36). La distribución intracelular podría deberse entonces a que las células de insecto, al no poseer las mismas chaperonas y enzimas de tráfico de proteínas, no tengan la capacidad de expresar receptores funcionales. Por esta razón los tres receptores se clonaron en el vector pCDNA4/TO y se transfectaron transitoriamente en células de mamífero HEK293T y en una línea de neuroblastoma (SH-SY5Y). Las imágenes de fluorescencia mostraron un poco más de localización a la membrana plasmática del receptor GPR3 y GPR12 (Fig. 6d-l), mientras que el GPR6 aparece localizado en su totalidad en agregados en el interior celular. No obstante, incluso en las células que expresaron GPR3 y 12 se distinguieron cúmulos de fluorescencia en el interior celular de gran tamaño, sugiriendo que una fracción significativa de receptores se encuentra en el interior celular (Fig. 6d).

Asimismo, cabe destacar que hay células con distintas morfologías, distinguiéndose potencialmente varias etapas. Parece ser que la expresión del receptor en primer lugar induce la formación de prolongaciones (indicado con un 1 en la Fig. 6). Esto tiene sentido ya que estos receptores se han asociado con el crecimiento de neuritas (7). Finalmente, parece ser que la sobreexpresión de estos receptores lleva a la muerte de las células (indicado con un 2 en la Fig. 6). Tanto la aparición de prolongaciones como la muerte celular sugiere que los receptores son funcionales al expresarlos en las células de mamíferos, independientemente de su localización celular. Por otro lado, también se observan en varias transfecciones la presencia de anomalías en el núcleo (círculos azules, Fig. 6c). Esto puede deberse a que estos receptores huérfanos están implicados en procesos de regulación de la meiosis (37), de manera que al expresarse en estas células sin un control estricto, puede darse desregulación de dichos procesos. Lo que vuelve a sugerir la funcionalidad de los receptores.

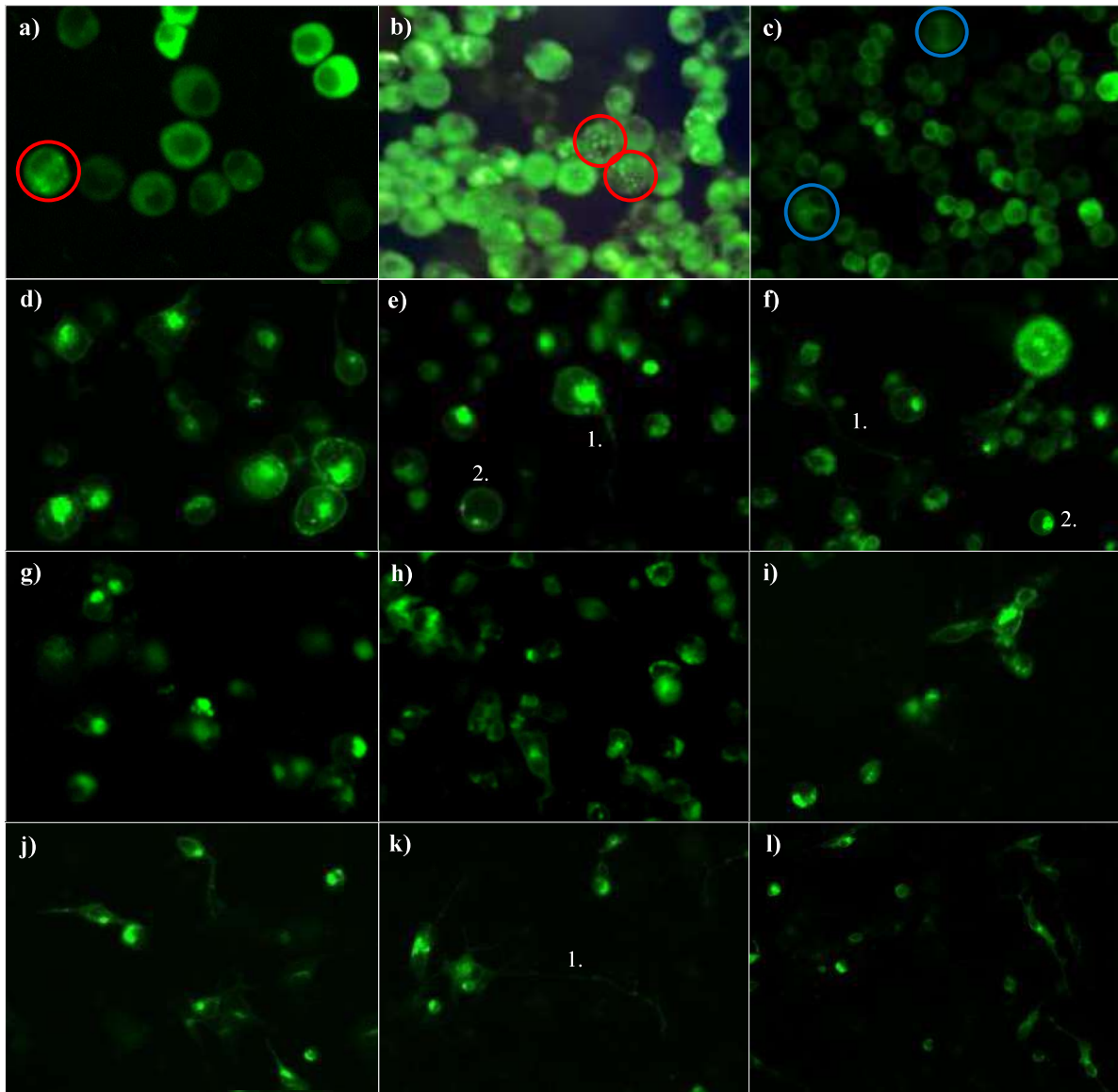


Figura 6. Expresión tras 48h seguida por microscopía de fluorescencia de: a) GPR3 en *Tni*, b) GPR6 en *Tni*, c) GPR12 en *Tni*, d), e) y f) GPR3 en HEK293T, g) GPR6 en HEK293T, h) GPR12 en HEK293T, i) GPR3 en SH-SY5Y, j) y k) GPR6 en SH-SY5Y, l) GPR12 en SH-SY5Y. Los círculos rojos marcan células con gránulos de fluorescencia en el interior; los círculos azules marcan células con anomalías en el núcleo y los números indican una posible sucesión de pasos.

Al expresarse en células de mamífero, la localización intracelular del receptor podría deberse, como se ha mencionado antes, a una internacionalización del receptor mediada por arrestina (desensibilización), y al observar las células a las 48h de transfección ya se ha desensibilizado en su mayoría. En base a esto se realizó nuevamente la transfección transitoria solamente con el GPR3 analizando su expresión a lo largo del tiempo (Fig. 7).

En el seguimiento de la expresión de GPR3 se observa que los dos primeros días hay células vivas que empiezan a formar prolongaciones (indicado con un 1 en la Fig. 7). Con el paso de las horas las células van muriendo (2 en la Fig. 7) y, finalmente, a las 72h la mayoría de las células han muerto y se despegan de la superficie, ya que se ven en varios planos. En todo momento las células presentan cúmulos de fluorescencia y no hay diferencias significativas en la localización de los receptores expresados en diferentes tiempos, ni cuando se expresan en células HEK293T ni comparado con la línea de neuroblastoma SH-SY5Y, lo que sugiere que una fracción importante se encuentra en el interior celular y que probablemente se encuentra en estado funcional.

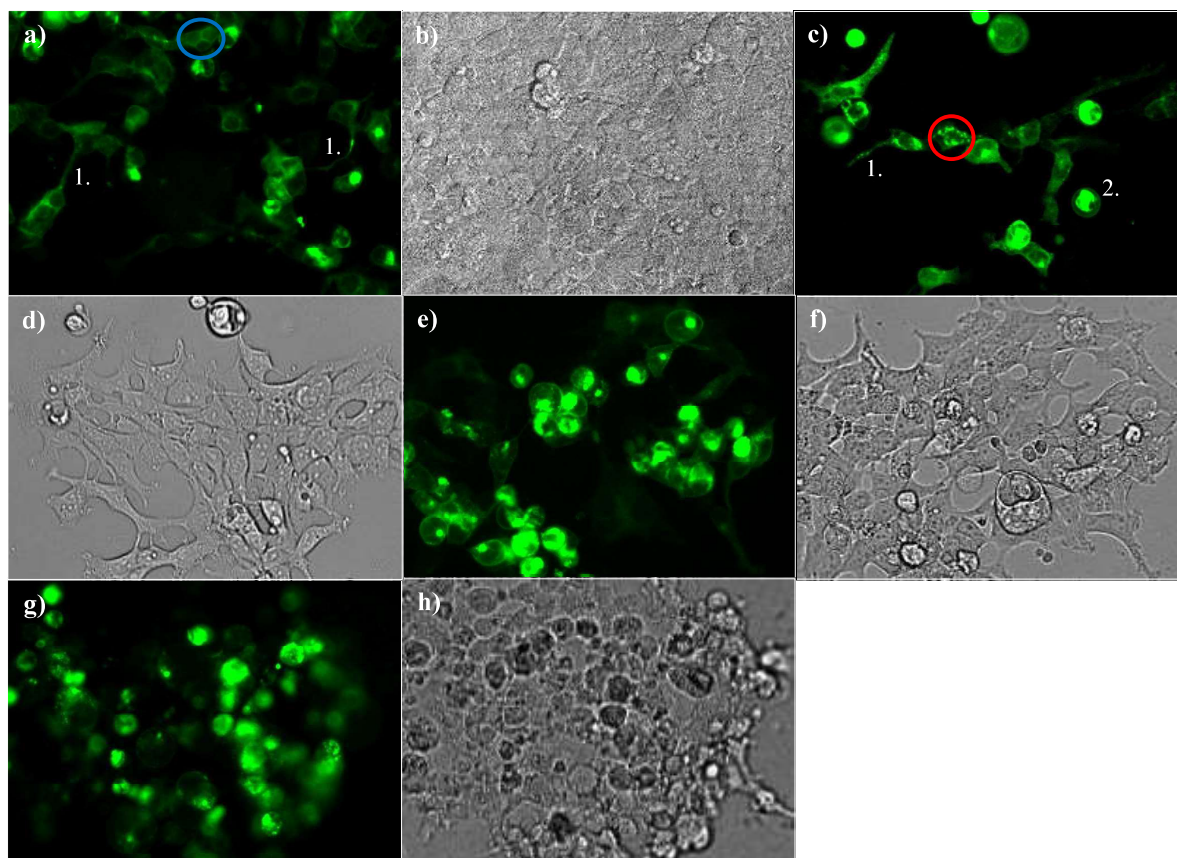
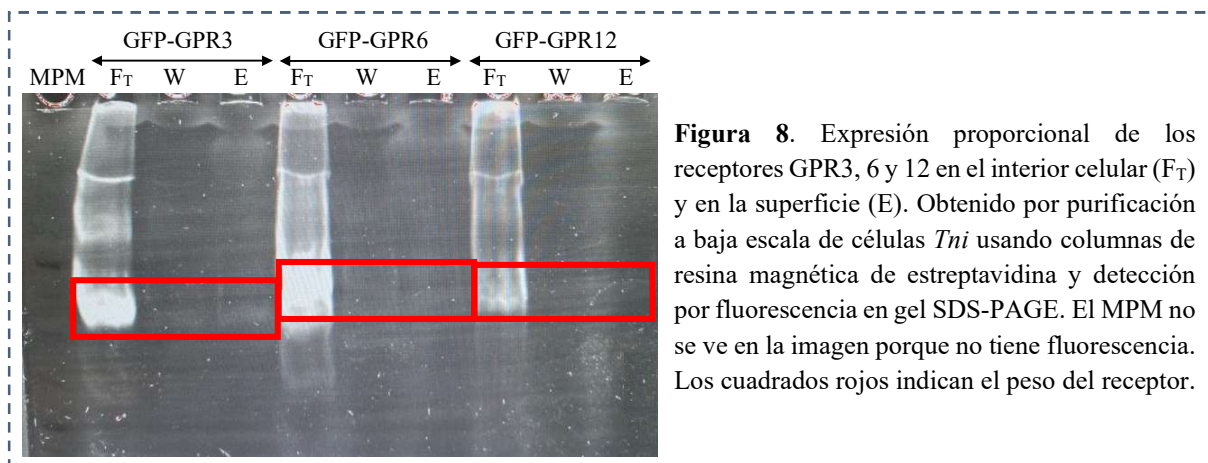


Figura 7. Seguimiento de la expresión de GPR3 por microscopía de fluorescencia en células HEK293T tras a)-b) 24h, c)-f) 48h y g)-h) 72h. Los círculos rojos marcan células con gránulos de fluorescencia en el interior; los círculos azules marcan células con anomalías en el núcleo y los números indican una posible sucesión de pasos.

Como la microscopía de fluorescencia (no confocal) carece de alta resolución, se utilizaron experimentos de biotilización de superficie para confirmar la proporción de receptores que se encuentran dentro y en la superficie de la célula. Para ello se transfectaron los receptores en células HEK293T y tras 48h se utilizaron ensayos de biotilización de superficie con Sulfo-NHS-SS-biotina. Este reactivo etiqueta proteínas y otras moléculas con aminas primarias que estén en la superficie celular (ya que la biotina no atraviesa la membrana). Los receptores marcados se purificaron mediante resina de estreptavidina magnética permitiendo una estimación cualitativa de la proporción de receptores en superficie respecto al total siguiendo la purificación mediante fluorescencia en gel SDS-PAGE. La Fig. 8 muestra que la mayoría de la proteína está en el interior celular mientras que en la membrana plasmática hay una fracción mínima.



En conclusión, los receptores se comportan de forma parecida tanto en células de insecto como en células HEK293T y SH-SY5Y. Como las células HEK293T que sobre-expresan los receptores sufren una mayor muerte celular que las correspondientes células sin transfectar, se deduce que los receptores son funcionales; o al menos el GPR3 (mayor localización en superficie y mayor estimulación de prolongaciones celulares). Esto se confirma más adelante mediante ensayos de funcionalidad del receptor GPR3 y 12 expresados en células de insecto (ver apartado *Resultados: Análisis de la actividad constitutiva de receptores huérfanos y Optimización de producción de GPR3, 6 y 12 para estudios de estructura-función*). Sin embargo, el GPR6 se comporta algo peor o con localización más interna que el GPR3 y 12.

4.2. ANÁLISIS DE ACTIVIDAD CONSTITUTIVA DE RECEPTORES HUÉRFANOS.

Para determinar si los receptores intracelulares y en la membrana son funcionales, así como para ver si poseen actividad constitutiva, se co-expresarán los receptores huérfanos y las MiniGs fusionadas a GFP, para seguir mediante fluorescencia la localización sub-celular de las proteínas G_s y G_o , que indicará únicamente la posición subcelular donde se exprese el receptor funcional y constitutivamente activo. Para ello, se hace uso de las proteínas Mini G_s 399 y Mini G_o 12 producidas por ingeniería genética y formadas únicamente por la subunidad α de la correspondiente proteína G, con capacidad de bloquear el receptor en el estado activo y quedarse unida (30,31). Para ello, se clonaron por un lado los receptores GPR3, 6 y 12 sin la GFP y, por otro, las Mini G_s y Mini G_o con una GFP en el N-terminal en el plásmido pCDNA4/TO (Fig. 9).

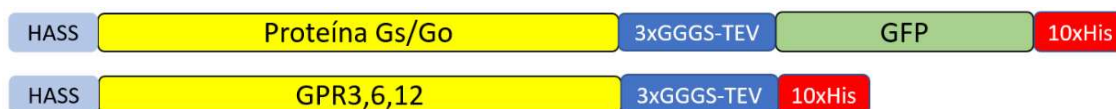


Figura 9. Representación esquemática de los constructos a clonar en pCDNA4 para estudio de la actividad constitutiva. HASS: HA signal sequence; GPR3, 6, 12: gen de interés; 3xGGGS: linker; TEV site: sitio de corte de la proteasa; 10xHis: cola de histidinas; proteína G_s/G_o : gen de interés; GFP: proteína fluorescente verde.

Para confirmar que los receptores sin GFP se expresan correctamente, se transfectaron células HEK293T con dichos receptores y se observó que estas células (Fig. 10b-d) presentan la misma morfología que al transfectar con los receptores fusionados con GFP (Fig. 6) y que la sobre-expresión de los receptores induce la muerte de las células. Eso contrasta con el control sin GPCR (Fig. 10a) que posee la morfología típica de las células HEK293T.

Para analizar el acoplamiento constitutivo con la proteína MiniG α_S , se transfecta un control únicamente con la proteína MiniG α_S (Fig. 10f); en él se aprecia una distribución homogénea por toda la célula. Sin embargo, al co-transfectar con cualquiera de los receptores huérfanos sin GFP (Fig. 10g-i), la fluorescencia se ubica en la membrana plasmática y un acúmulo en el interior celular para los tres receptores; este es el mismo patrón obtenido cuando se transfectan los receptores fusionados a GFP (Fig. 6d-h). Estos resultados sugieren que los receptores son constitutivamente activos, ya que no hace falta ligando endógeno para atrapar las proteínas G. Además, se muestran activos y funcionales tanto los receptores de la membrana plasmática como los receptores del interior celular.

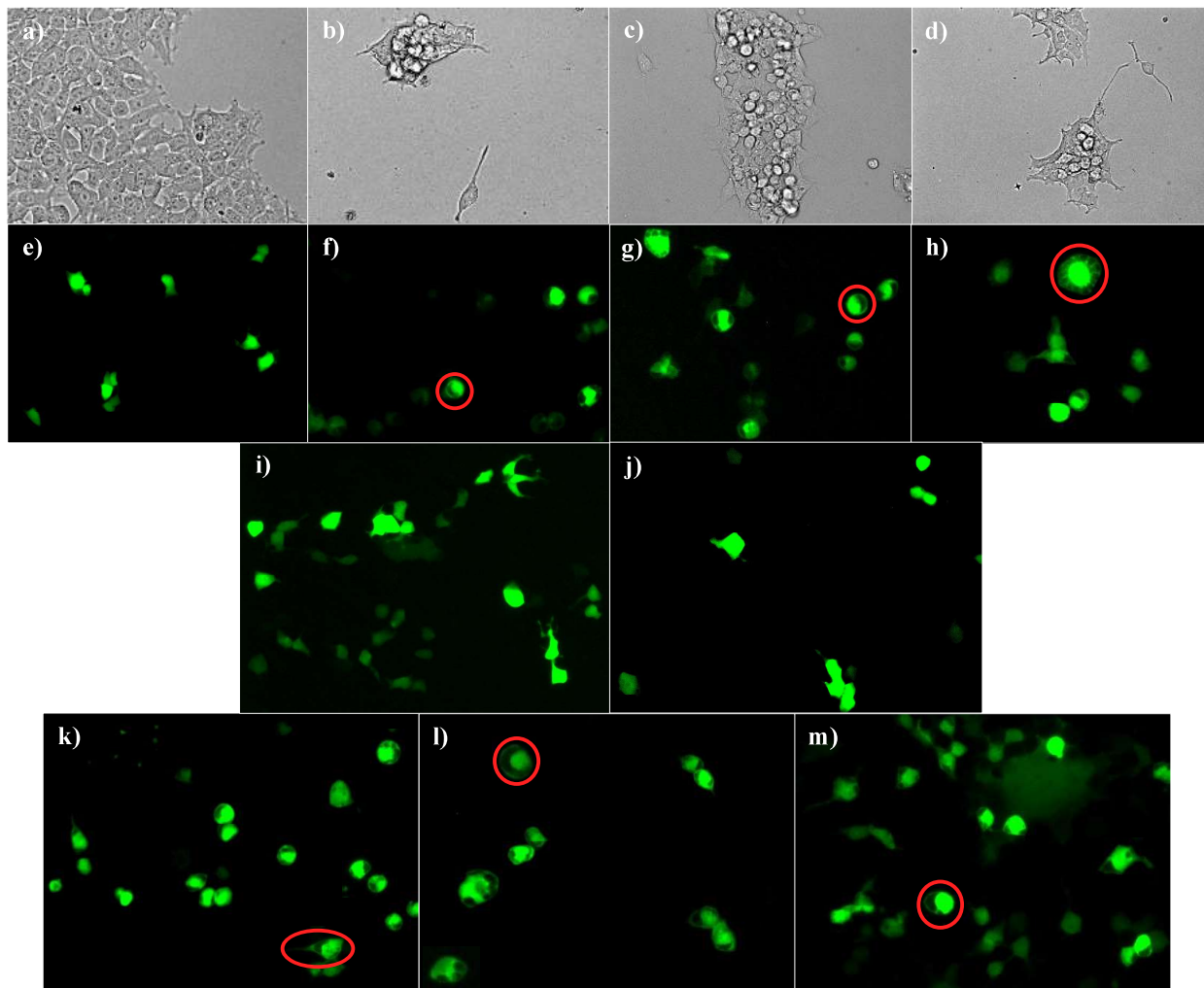


Figura 10. Expresión en células HEK293T tras 24h. **a)** y **e)** Control G α_S , **i)** Control G α_O , **b)** Control GPR3 sin GFP, **c)** Control GPR6 sin GFP, **d)** Control GPR12 sin GFP, **j)** Control D $_3$ R+G α_O , **f)** GPR3+G α_S , **g)** GPR6+G α_S , **h)** GPR12+G α_S , **k)** GPR3+G α_O , **l)** GPR6+G α_O , **m)** GPR12+G α_O . Los círculos rojos marcan células con distribución de fluorescencia no homogénea.

Algunos ensayos defienden que dichos receptores presentan actividad constitutiva con doble acoplamiento a las proteínas G α_S y G $\alpha_{i/O}$. No obstante, todavía existe bastante controversia entre grupos de investigación (12). Por ello, los receptores se co-transfectaron también con proteínas G de tipo G $_O$ para observar si los receptores unen a ambas proteínas. Se transfectó también la proteína MiniG α_O como control negativo (Fig. 10j) y, además, otro control co-transfectando el receptor D $_3$ R (Receptor de dopamina D3) con la proteína G $_O$, que se sabe que no acopla constitutivamente con la G $_O$. Se observa que en ambos casos la proteína G $_O$ tiene una localización homogénea por toda la célula, al igual que la proteína G α_S (Fig. 10e). En cambio, al co-transfectar con GPR3, 6 o 12, la fluorescencia se vuelve a situar en la membrana plasmática y un cúmulo en el interior celular (Fig. 10k-m).

También cabe destacar que, aunque anteriormente se había observado formación de neuritas por la presencia de los receptores huérfanos, en este caso no se aprecian. Esto se debe a lo comentado anteriormente, la proteína MiniG_S399 y MiniG_O12 se unen al receptor bloqueándolo, de manera que no se inicia la vía de señalización y no veremos los efectos funcionales de los receptores.

Estos resultados indican que los receptores huérfanos GPR3, 6 y 12 son constitutivamente activos y presentan doble acoplamiento con la proteína G α_s y G α_o . Adicionalmente, esto se confirma determinando la T_m del receptor libre e incubado con proteína G para obtener resultados más concluyentes donde no hay ligandos endógenos desconocidos (ver apartado *Resultados: Optimización de producción de GPR3, 6 y 12 para estudios de estructura-función*).

4.3. OPTIMIZACIÓN DE PRODUCCIÓN DE GPR3, 6 Y 12 PARA ESTUDIOS DE ESTRUCTURA-FUNCIÓN.

Uno de los objetivos del proyecto es entender los mecanismos estructurales de la actividad constitutiva de los receptores huérfanos GPR3, 6 y 12. Para ello necesitamos producir receptor funcional y en cantidades significativas. Por ello, después de analizar la expresión de los tres receptores en células de insecto, nos preguntamos si podemos aumentar la expresión del receptor o aumentar la localización a la membrana plasmática (síntoma de receptor funcional en los GPCR, aunque no en este caso como se ha visto posteriormente). Por ello, se diseñaron distintos constructos para GPR12 con diversas modificaciones relevantes en la regulación de su expresión y localización. Se ensayó en uno de los tres receptores, ya que al ser parálogos, la información que se extraiga sobre mutaciones más relevantes se puede transferir a los otros dos.

Al constructo de origen GPR12_1 (Fig. 5, *Anexo III*) se le realizaron diferentes inserciones, deleciones y mutaciones puntuales (Fig. 12, Tabla 2). La expresión y localización de las variantes se determina por fluorescencia en células de insecto después de una transfección transitoria, por lo que en todos los casos tenemos el constructo clonado en el vector de expresión pLEX.

Modificaciones realizadas:

Nombre	Constructo						Modificación
GPR12_2	HASS	FLAG	GPR3,6,12	3xGGGS-TEV	GFP	10xHis	Adición de FLAG
GPR12_3	HASS		GPR3,6,12	3xGGGS-TEV	GFP	10xHis	Mutación 3.41W
GPR12_4	HASS		GPR3,6,12	3xGGGS-TEV	GFP	10xHis	Delección Δ-Nter L9
GPR12_5	HASS		GPR3,6,12	3xGGGS-TEV	GFP	10xHis	Delección Δ-Nter I25
GPR12_6	HASS		GPR3,6,12	3xGGGS-TEV	GFP	10xHis	Delección Δ-Nter V33
GPR12_7	HASS		GPR3,6,12	3xGGGS-TEV	GFP	10xHis	Delección Δ-Nter V7
GPR12_8	HASS		GPR3,6,12	3xGGGS-TEV	GFP	10xHis	Delección Δ-Nter E23
GPR12_9	HASS		GPR3,6,12	3xGGGS-TEV	GFP	10xHis	Delección Δ-Cter I320
GPR12_10	HASS		GPR3,6,12	3xGGGS-TEV	GFP	10xHis	Delección Δ-Cter I315
GPR12_11	HASS		GPR3,6,12	3xGGGS-TEV	GFP	10xHis	Delección Δ-Cter Q326
GPR12_12	HASS		GPR3,6,12	3xGGGS-TEV	GFP	10xHis	Mutación C316A
GPR12_13	HASS		GPR3,6,12	3xGGGS-TEV	GFP	10xHis	Mutación C317A
GPR12_14	HASS		GPR3,6,12	3xGGGS-TEV	GFP	10xHis	Mutación C319A
GPR12_15	HASS		GPR3,6,12	3xGGGS-TEV	GFP	10xHis	Mutación DRY-AAY
GPR12_16			GPR3,6,12	3xGGGS-TEV	GFP	10xHis	Delección HASS

Tabla 2. Diferentes modificaciones (inserciones, deleciones y mutaciones puntuales) realizadas en el receptor GPR12 con el fin de analizar su actividad constitutiva y localización subcelular.

Resultados obtenidos:

Construeto	Comentario	Resultado
GPR12_2 (FLAG)	Adición de una secuencia señal para ver si mejora su expresión en la membrana plasmática, ya que en los receptores WT se ha observado alta expresión en el interior.	Igual que WT (Fig. 13b)
GPR12_3 (3.41W)	La presencia de triptófano en esa posición se ha visto que mejora la expresión de otros GPCR en la membrana plasmática (38).	Muy parecido al WT (Fig. 13c)
GPR12_4 (Δ-Nter L9)	Corte después de la Asn8 con glicosilación predicha para estudiar la diferencia de expresión del receptor en ausencia de esa PTM.	↓↓ expresión (Fig. 13d)
GPR12_5 (Δ-Nter I25)	Corte después de la Asn24 con glicosilación predicha para estudiar la diferencia de expresión del receptor en ausencia de esa PTM.	↓↓ expresión (Fig. 13e)
GPR12_6 (Δ-Nter V33)	Corte del extremo N-terminal para estudiar la esencialidad de dicho extremo en la expresión del receptor.	↓↓↓ expresión (Fig. 13f)
GPR12_7 (Δ-Nter V7)	Corte antes de la Asn8 con glicosilación predicha para estudiar la diferencia de expresión del receptor en presencia de esa PTM.	Igual que WT (Fig. 13g)
GPR12_8 (Δ-Nter E23)	Corte antes y después de la Asn24 con glicosilación predicha para estudiar la diferencia de expresión del receptor en ausencia/presencia de esa PTM.	Sin expresión del receptor (Fig. 13h)
GPR12_9 (Δ-Cter I320)	Corte del extremo C-terminal para estudiar la esencialidad de dicho extremo en la expresión del receptor. Sin presencia del motivo CCXC.	↓↓ expresión (Fig. 13i)
GPR12_10 (Δ-Cter I315)	Corte del extremo C-terminal para estudiar la esencialidad de dicho extremo en la expresión del receptor. En presencia del motivo CCXC.	↓↓↓ expresión (Fig. 13j)
GPR12_11 (Δ-Cter Q326)	Corte antes de la Ser330 y Ser332 con fosforilación predicha para estudiar la diferencia de expresión del receptor en ausencia de esa PTM.	↓↓ expresión (Fig. 13k)
GPR12_12 (C316A)	Mutación de la secuencia CCXC, un motivo muy conservado en esta familia de receptores huérfanos y cuya función se desconoce.	↓ expresión (Fig. 13l)
GPR12_13 (C317A)	Mutación de la secuencia CCXC, un motivo muy conservado en esta familia de receptores huérfanos y cuya función se desconoce. Además, se ha predicho palmitoilación en esta cisteína (39).	↓↓ expresión (Fig. 13m)
GPR12_14 (C319A)	Mutación de la secuencia CCXC, un motivo muy conservado en esta familia de receptores huérfanos y cuya función se desconoce.	↓↓ expresión (Fig. 13n)
GPR12_15 (DRY-AAY)	Mutación del motivo DRY, altamente conservado en distintos GPCR y que participa en el acoplamiento de la proteína Gα (40). Ver si al mutarlo se modifica su expresión/localización.	Igual que WT (Fig. 13ñ)
GPR12_16 (no HASS)	Quitar la secuencia señal para analizar si influye en su transporte a la membrana plasmática o de algún compartimento	↓↓ expresión (Fig. 13o)

Tabla 3. Razonamiento de la posible relevancia de las diferentes modificaciones (inserciones, delecciones y mutaciones puntuales) realizadas en el receptor GPR12 y el resultado obtenido en cuanto a los niveles de expresión.

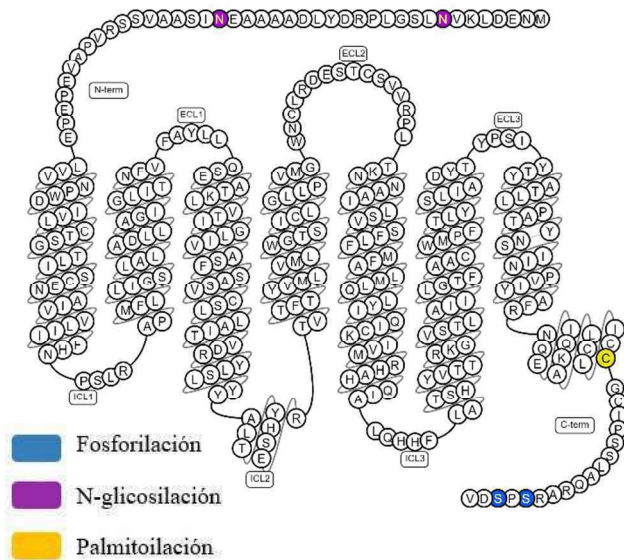


Figura 11. Estructura del GPCR12 con las modificaciones postraduccionales que se han predicho. En azul se muestran las fosforilaciones en serinas, en morado las N-glicosilaciones y en amarillo la palmitoilación. Fuente: Uniprot (39).

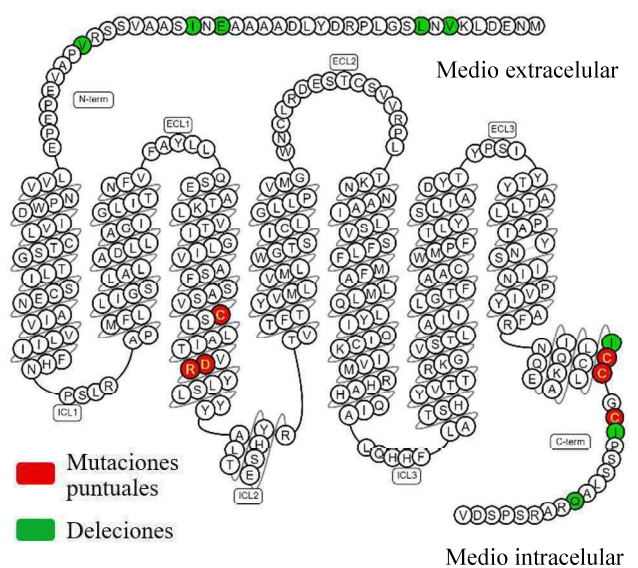


Figura 12. Estructura del GPCR12 con las mutaciones puntuales realizadas en el presente estudio. En rojo se muestran las mutaciones puntuales y en verde las deleciones.

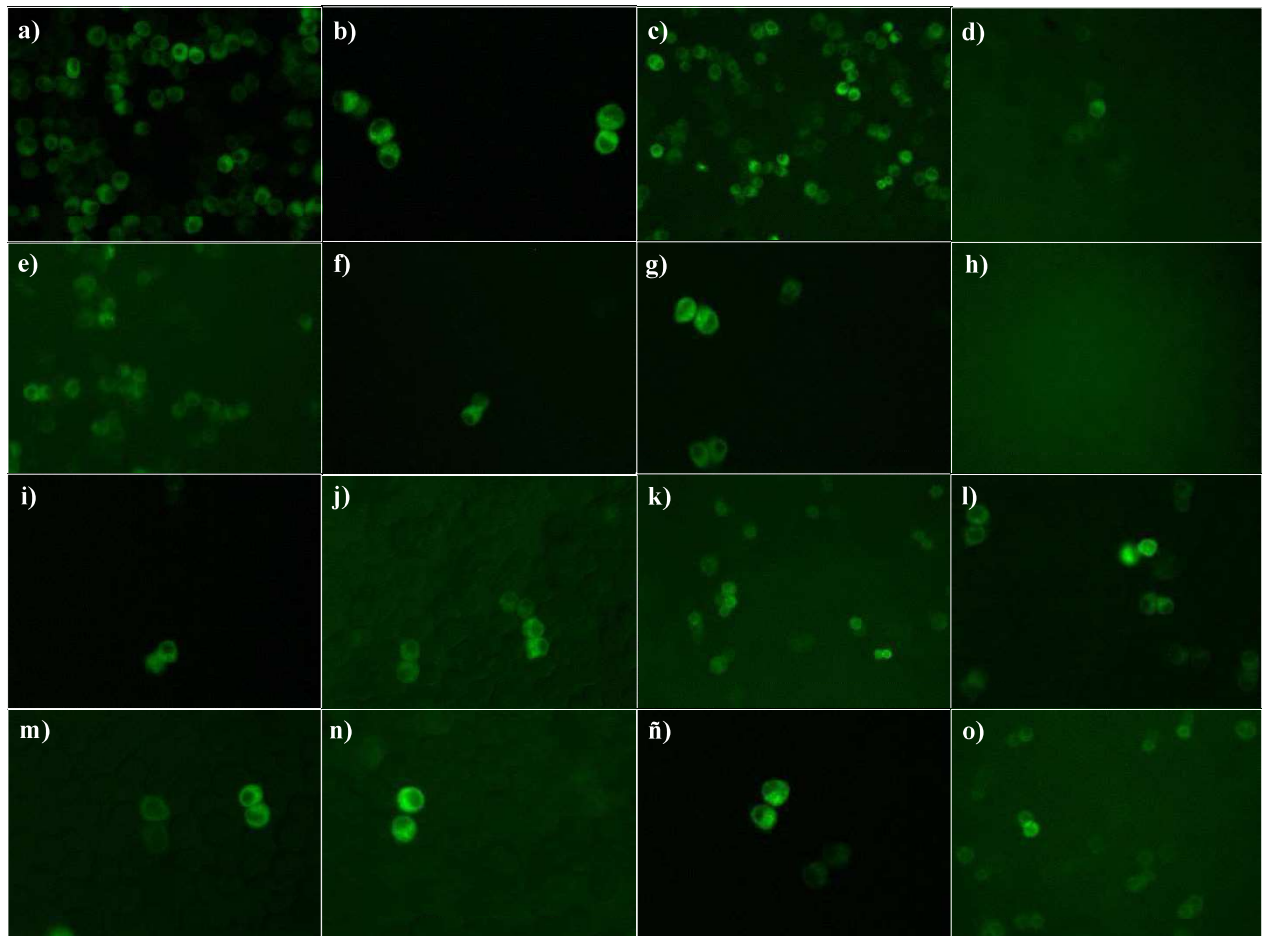


Figura 13. Expresión en Tni (transfección del vector pIEX, 24-well, DNA-PEI (1:2)) tras 48h del receptor a) GPCR12_1 (WT) y los distintos mutantes: b) GPCR12_2 (FLAG), c) GPCR12_3 (3.41W), d) GPCR12_4 (Δ -Nter L9), e) GPCR12_5 (Δ -Nter I25), f) GPCR12_6 (Δ -Nter V33), g) GPCR12_7 (Δ -Nter V7), h) GPCR12_8 (Δ -Nter E23), i) GPCR12_9 (Δ -Cter I320), j) GPCR12_10 (Δ -Cter I315), k) GPCR12_11 (Δ -Cter Q326), l) GPCR12_12 (C316A), m) GPCR12_13 (C317A), n) GPCR12_14 (C319A), ñ) GPCR12_15 (DRY-AAY), o) GPCR12_16 (no HASS).

Tras analizar la expresión y localización de estas 15 variantes de GPR12, no se encuentra ninguna variante con una expresión ni localización en la membrana plasmática aumentada. No obstante, se pueden extraer otras conclusiones estructurales relevantes. La presencia de un triptófano en la posición 41 de la hélice transmembrana III (3.41W) (Ballesteros-Weinstein numbering) es importante en otros GPCR para su localización subcelular (41). Este triptófano está muy conservado (94%) entre distintos GPCR de clase A (42) y se ha visto que interacciona con el anillo de esterol del colesterol de la membrana plasmática, esencial en la regulación de la función de los GPCR (43). Los receptores huérfanos de este estudio son de tipo rodopsina de clase A. No obstante, en este caso la mutación 3.41W no mejora la expresión (Fig. 13c). Además, la adición de FLAG tampoco ayuda a que se exprese mejor en la superficie (Fig. 13b).

En cuanto al N-terminal, cabe destacar la **Asn8**, aminoácido en el que se ha predicho N-glicosilación (Fig. 11). En general, los GPCR presentan una N-glicosilación en una Asn extracelular, crucial para el correcto plegamiento del receptor y expresión en la superficie celular (44). Al cortar la secuencia justo delante (Fig. 13g), no se modifica su expresión; mientras que, al cortar detrás y eliminarla, vemos que la expresión disminuye drásticamente (Fig. 13d). Esto refleja la importancia de esa N-glicosilación en el correcto plegamiento. En ausencia de la Asn8, el receptor no se pliega correctamente y la mayor parte de proteína es probablemente degradada en el proteasoma. Asimismo, si se elimina todo el extremo N-terminal (Fig. 13f), prácticamente no queda expresión del receptor.

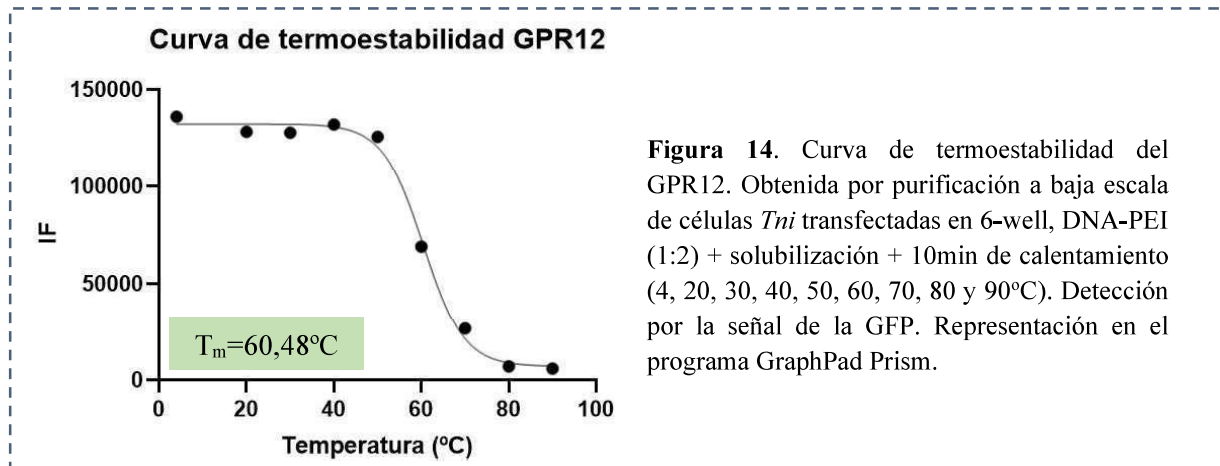
Respecto al C-terminal, lo que más llama la atención es la importancia estructural del **motivo CCXC**, ya que al realizar mutaciones puntuales en alguno de estos aminoácidos (Fig. 13l-n), disminuye la expresión del receptor (sobre todo en la mutación C319A). Aunque inicialmente se mutó con la intención de promover la localización a la membrana plasmática, se concluye que son aminoácidos muy relevantes en la expresión. Secuencias de varias cisteínas seguidas suelen correlacionarse con función quelante de Zn^{2+} , que participa en la sinapsis. Aunque en este caso el motivo es intracelular, es poco probable que se corresponda con esto, pero la captación de metales es algo que se puede explorar en el futuro. Asimismo, igual que antes, al eliminar todo el extremo C-terminal (Fig. 13j), prácticamente no queda expresión del receptor.

Finalmente, cabe destacar que con la delección Δ -Cter Q326 solo se están eliminando **serinas** en las que se ha predicho fosforilación (Fig. 11). Los GPCR a menudo se fosforilan en el extremo C-terminal en respuesta a diversos estímulos extracelulares, de manera que promoverían el reclutamiento de arrestina iniciando la desensibilización e internalización transitoria del receptor (45,46). Al eliminar estas serinas (Fig. 13k), se observa una disminución de la expresión, lo que indica la importancia del extremo C-terminal en el plegamiento o expresión. No obstante, no se aprecia cambio en la localización subcelular, lo que insinúa que la localización intracelular no se debe a la internalización por parte de la β -arrestina, aunque estos experimentos deberían hacerse en células de mamíferos. Esto parece indicar que el receptor GPR12 se localiza en compartimentos intracelulares por mecanismos independientes de la β -arrestina; y podría ser que esté señalizando desde el interior celular al igual que se ha visto con GPR6 (17). Asimismo, cabe destacar que los ligandos putativos (S1P, DHS1P y SPC) son lípidos que pueden atravesar la membrana fácilmente y acceder al receptor intracelular, lo que apoyaría esta hipótesis.

Por último, la **mutación DRY-AAY** se ve igual que el WT (Fig. 13ñ). Esto indica que no afecta a la expresión del receptor ni a la localización, pero es probable que afecte al acoplamiento de proteína G y a la actividad constitutiva.

En conclusión, tanto la Asn8 (probablemente N-glicosilada) como el motivo CCXC presentan una gran relevancia en el correcto plegamiento y expresión del receptor.

Para entender si hay presencia de cúmulos de proteína no funcional en el interior de las células de insecto, se realizó una curva de termoestabilidad en la que se midió la T_m del GPR12 solubilizado después de transfectarlo transitoriamente (Fig. 6c). Los resultados de este ensayo muestran que la T_m del GPR12 corresponde a 60,48°C, por lo que se concluye que las células no presentan agregados de la proteína, sino que el receptor tiene la estructura correcta y se expresa en la membrana de compartimentos; siendo muy posiblemente funcional, ya que en las transfecciones se observaron anomalías en el núcleo. En contraste, si el receptor estuviese agregado, los valores de fluorescencia a 4°C serían iguales que a 100°C.



Para comenzar la producción a gran escala se generó un baculovirus para el receptor GPR3, ya que es del que tenemos más información y el que mejor se expresa en membrana en células HEK293T. Se utilizó el sistema flashBAC™ y se generó un virus en células de insecto *Sf9*. En la Fig. 15a se observa el pase 3 (P3) en el microscopio de fluorescencia, lo que confirmó que el virus se había producido correctamente y que poseía un buen título, basado en el gran porcentaje de células que expresaban el receptor. En general, se usan las *Tni* para la producción de proteínas de membrana (26). Sin embargo, en este caso sólo un porcentaje ínfimo de *Tni* expresaba el receptor (Fig. 15b-c). Por ello se produjo el receptor en células *Sf9* con un baculovirus en pase P4 obteniendo expresión del receptor en casi el 100% de las células del cultivo (Fig. 15d-e).

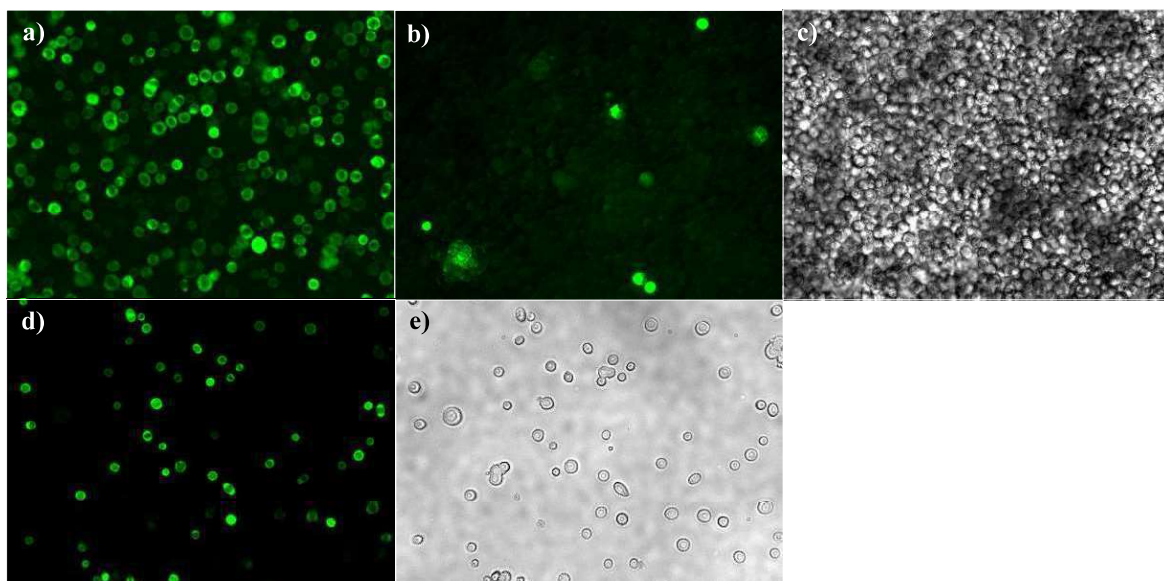
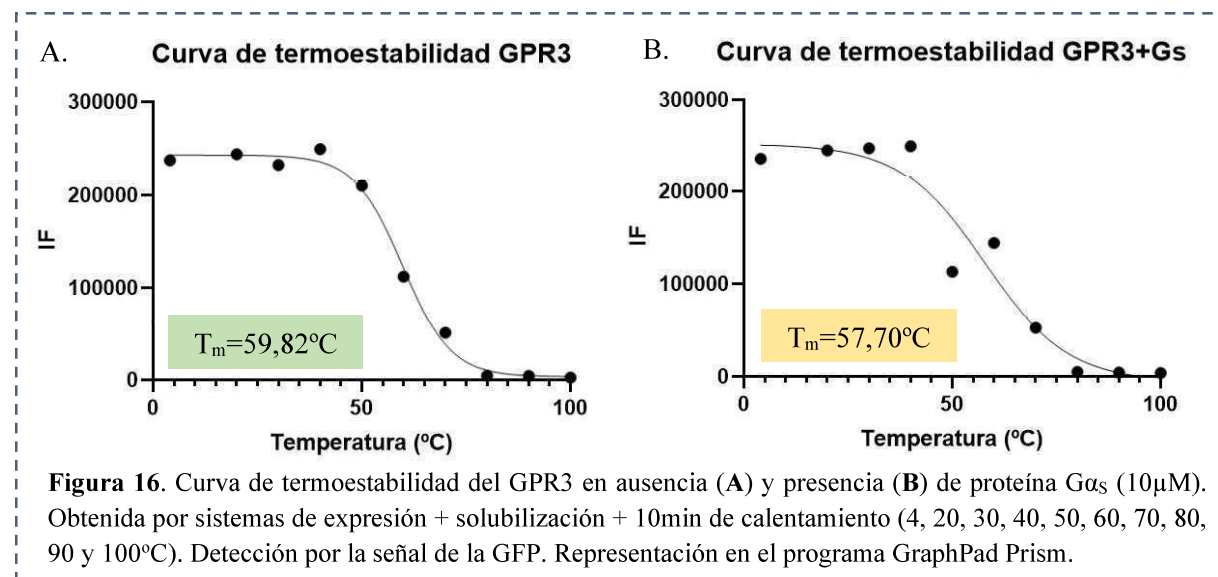


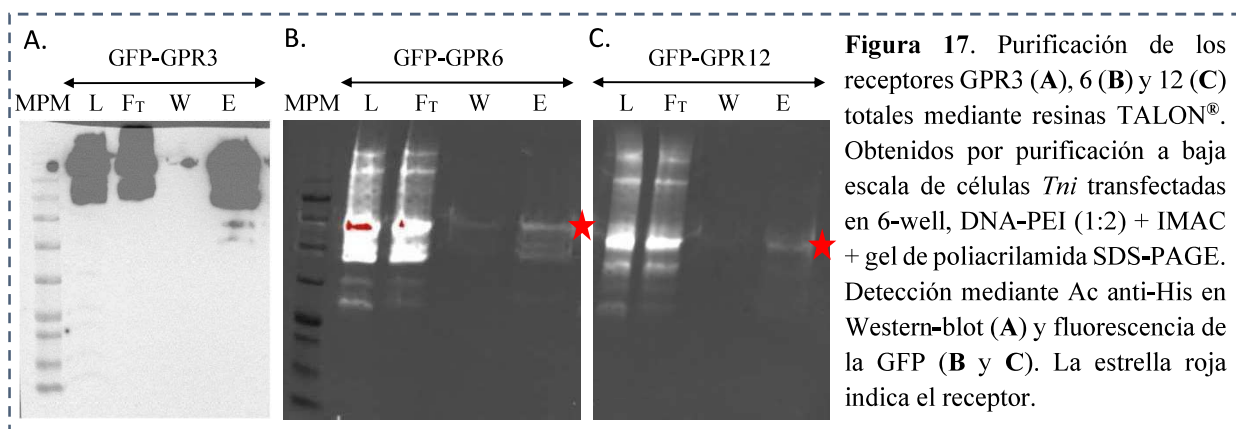
Figura 15. Expresión de GPR3 en células de insecto tras infectarlas con baculovirus (sistema de expresión de baculovirus flashBAC™). a) P3 en *Sf9*, b)-c) P4 en *Tni* y d)-e) P4 en *Sf9*. La densidad celular no es proporcional a la del stock, se cogió una alícuota para analizar la fluorescencia.

Después de expresar el GPR3 en *Sf9* se realizó un ensayo de termoestabilidad (Fig. 16A) para confirmar que el receptor no estaba agregado dentro de las células. El GPR3 posee una T_m muy parecida a la del GPR12 (Fig. 14) (59,82 vs 60,48°C), lo que sugiere que el receptor está correctamente plegado. Además, se comprueba que es funcional y constitutivamente activo calculando la T_m en presencia de MiniGs (Fig. 16B), lo que desplaza la T_m 2°C indicativo de una interacción. Llama la atención que se obtiene un valor de T_m menor en presencia que en ausencia de MiniGs, lo que indica que la unión de la proteína Gs desestabiliza al receptor. Estos resultados serían concluyentes sobre la actividad constitutiva ya que no se basan en los niveles de AMPc y se elimina la presencia de un posible ligando ubicuo. Sin embargo, solo se tuvo tiempo para realizar estos experimentos una sola vez por lo que requeriría repetirlos para confirmar el resultado.



En conclusión, la expresión del GPR3 es significativamente más alta cuando se expresa en células *Sf9* que en *Tni*. Asimismo, se ha demostrado que el GPR3 es constitutivamente activo y que se acopla al menos con la proteína $G_{\alpha s}$.

Además de la curva de termoestabilidad, se llevó a cabo la purificación de los receptores recombinantes GPR3, 6 y 12 de las células *Tni* mediante resinas TALON® con el fin de empezar a optimizar su purificación.



Esta técnica permite purificar proteínas marcadas con histidina, es decir, el receptor huérfano de interés.

Para monitorizar el resultado se utilizó Western-blot con un anticuerpo anti-His frente a la cola de histidinas (en el caso del GPR3), mientras que en los experimentos con el GPR6 y 12 se utilizó la fluorescencia en gel de la GFP ya que se veía mejor la proteína. El anticuerpo anti-His muestra bandas inespecíficas. Como resultado se obtiene que la mayor parte de los receptores están en el F_T (Flow-through), y no se unen a la resina. Se deberían realizar más pruebas con otros sistemas de purificación para determinar el sistema óptimo para los receptores GPR3, 6 y 12.

5. DISCUSIÓN:

Este trabajo ha pretendido caracterizar los receptores huérfanos GPR3, 6 y 12 humanos con relevancia en el sistema nervioso central e implicación en la EA. Para ello, se han abordado distintos objetivos: caracterización de la expresión, localización subcelular y funcionalidad de los receptores; determinación de la actividad constitutiva, así como de la capacidad de doble acoplamiento a proteínas G_s y G_{i/o}; y comenzar los estudios de estructura-función con la intención de entender a largo plazo dicho mecanismo de actividad constitutiva.

Tras los primeros ensayos de expresión transitoria en células de insecto (*Tni*) y de mamífero (HEK293T y SH-SY5Y) (Fig. 6) se observan gránulos de fluorescencia en el interior celular y no expresión exclusivamente en la membrana plasmática como cabría esperar. Se pueden descartar cúmulos de proteína no funcional en el interior celular ya que se advierte muerte celular y crecimiento de prolongaciones en aquellas células con sobre-expresión de los receptores. Asimismo, las curvas de termoestabilidad (Fig. 14 y 16) y los posteriores ensayos celulares con MiniGs apoyan las mismas conclusiones. De esta forma se concluye que **los receptores se expresan de forma funcional**, tanto en la membrana plasmática como en las membranas intracelulares. Esto no es probable que sea mediante sistemas de desensibilización por parte de la β -arrestina como mecanismo de control de su actividad constitutiva ya que en el seguimiento de expresión del GPR3 en células HEK293T no se apreció una localización inicial a membrana con posterior desplazamiento al interior celular. Las limitaciones del presente estudio se basan en la falta de microscopio confocal para determinar con exactitud (utilizando doble inmunomarcaje) el orgánulo donde se encuentran principalmente.

En ensayos anteriores se ha propuesto que GPR3, 6 y 12 son constitutivamente activos (12). En el presente estudio se han obtenido resultados que apoyan dicha hipótesis tanto en ensayos celulares en HEK293T que co-expresan los receptores y proteínas MiniG_s399 y MiniG_o12 (Fig. 10) como por desplazamiento de la curva de termoestabilidad en presencia/ausencia de MiniG_s (Fig. 16). Estos resultados son concluyentes sobre la actividad constitutiva ya que no se basan en los niveles de AMPc (que está más abajo en la cascada de señalización y son susceptibles de alteración por otros factores) y se minimiza la posibilidad de presencia de un posible ligando ubicuo desconocido. Además, se observa en los ensayos celulares que los receptores activan tanto proteínas G_s como G_{i/o}. Esto es interesante porque ambas proteínas G tienen funciones opuestas (activación o inhibición de la producción de AMPc), por lo que sería muy interesante utilizar curvas de termoestabilidad para el GPR6 y 12 tanto para la proteína G_s como G_o; y poder **confirmar, tanto *in vivo* como *in vitro*, que los receptores huérfanos GPR3, 6 y 12 son constitutivamente activos y presentan doble acoplamiento con la proteína G_s y G_{i/o}**. Se desconoce cómo los receptores son capaces de acoplar ambos tipos de proteínas G con la misma facilidad (aunque es necesario realizar un estudio cuantitativo para determinar si las dos se unen con la misma eficacia). Una posibilidad sería que los receptores en la membrana y en el interior celular activasen diferentes proteínas G, activando señalización específica dependiente de la localización subcelular. En estos estudios no se ha visto una diferencia de distribución de MiniG_s o MiniG_o pero se requerirán experimentos en un microscopio de fluorescencia confocal para confirmarlo.

Lo que se puede confirmar es que los receptores intracelulares unen proteínas G, lo que sugiere que señalizan desde el interior celular. Siguiendo la misma línea, ya se ha sugerido anteriormente que GPR6 podría señalizar intracelularmente (17), por lo que cabe la **posibilidad de que GPR3 y 12 señalicen desde el interior celular**. Asimismo, esto está apoyado por el hecho que los ligandos putativos (S1P, DHS1P y SPC) son lípidos que pueden atravesar la membrana fácilmente y acceder al receptor intracelular.

Debido a que la sobreexpresión de GPR3, 6 y 12 está relacionada con enfermedades neurodegenerativas (8), lo más probable es que su actividad constitutiva presente una regulación estricta diferente. Recientemente se ha publicado un artículo donde se ha visto que el GPR3 se expresa también en adipocitos y que la temperatura regula su expresión, que genera un receptor constitutivo. El receptor activa entonces la lipólisis (47). Por ello, se podría especular que es la expresión del receptor lo que se regula en el sistema nervioso central, aunque es difícil especular qué factores lo regularían. No obstante, de alguna forma debería estar regulada su actividad constitutiva, ya que son receptores involucrados en multitud de funciones fisiológicas. En un estudio anterior se ha publicado que la actividad constitutiva de GPR3 y 12 aumenta la cantidad de AMPc, manteniendo de esta forma la detención meiótica en el ovocito. Además, defienden que esta actividad estaría regulada por los niveles de GMPc que controlan la actividad de la PDE (fosfodiesterasa), que a su vez regula los niveles de AMPc intracelulares, implicados en la detención de la meiosis (48).

Finalmente, a fin de aumentar la expresión, se llevó a cabo un análisis de la actividad de mutantes de GPR12. Aunque no se consiguió incrementar la expresión, se concluye una **gran relevancia de la N-glicosilación en la Asn8** (Fig. 13g y d) **y del motivo CCXC** (Fig. 13l-n) para la expresión del receptor. Aunque la glicosilación en el N-terminal se ha visto que es importante para la expresión y tráfico de otros GPCR, el motivo XCXC es específico de los receptores huérfanos (*Anexo V*). Finalmente, cabe añadir que, aunque por experiencia en el laboratorio se obtiene expresión de proteínas tres veces mejor en *Tni* que en *Sf9*; es curioso que, tras varios intentos, sólo se ha obtenido expresión del receptor GPR3 en *Sf9*, pero no en *Tni* (Fig. 15). Las células *Tni* están modificadas genéticamente para facilitar el tráfico de proteínas secretadas (incluyendo proteínas de membrana, que siguen la misma ruta). Esto sugiere una buena expresión del receptor en el interior celular.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS:

Los siguientes pasos irán dirigidos a determinar, mediante microscopía confocal, la localización subcelular exacta y si hay diferencias en la unión a proteínas G_s y G_o entre los diferentes compartimentos. Esto se haría después de confirmar la actividad constitutiva *in vitro* de GPR3, 6 y 12 con las proteínas G_s y G_o mediante ensayos de termoestabilidad. Asimismo, la exploración del motivo XCXC en los receptores se estudiará en estos procesos.

Tras observar que las células de insecto (*Tni*) y de mamífero (HEK293T y SH-SY5Y) expresan los receptores funcionales y que éstos se acoplan a las proteínas MiniG_s399 y MiniG_o12, se procederá a la purificación del receptor a gran escala en células de insecto para luego reconstituir *in vitro* el complejo con proteínas $G\alpha\beta\gamma$ y su determinación estructural por microscopía electrónica. Esto nos servirá para determinar el mecanismo estructural de actividad constitutiva, así como para ver cómo es posible que el mismo receptor acople a proteínas G_s y G_o .

Finalmente, la producción de los receptores GPR3, 6 y 12 abre las puertas a realizar ensayos de termoestabilidad con los ligandos endógenos propuestos para ver si se unen *in vitro*, así como a hacer un cribado de ligandos para buscar posibles neurotransmisores endógenos. Esto podría llevar al desarrollo de nuevos fármacos para tratar enfermedades del sistema nervioso central.

7. CONCLUSIÓN:

CONCLUSIONES

La finalidad del presente estudio es la caracterización de los receptores huérfanos GPR3, 6 y 12 humanos, con implicación en enfermedades del sistema nervioso central. Después de ensayar los receptores en varias líneas celulares eucariotas, se obtiene receptor funcional con expresión localizada tanto en la membrana plasmática como en el interior celular. Se confirma la actividad constitutiva del GPR3 y el acoplamiento a la proteína G_s mediante ensayos *in vivo* de co-transfección con el receptor y la Mini G_{s399} y seguimiento de la localización de la proteína G; así como mediante ensayos *in vitro* de desplazamiento térmico simple (GFP-TS). Se trata de los primeros resultados no basados en los niveles de AMPc. Además, dichos estudios *in vitro* son concluyentes ya que se elimina la presencia de un posible ligando ubicuo. Igualmente, se realizaron ensayos de co-transfección con el GPR6 y 12 y se repitieron para todos los receptores con la Mini G_{o12} , indicando para los tres receptores una actividad constitutiva y doble acoplamiento con las proteínas G_s y $G_{i/o}$. No se entendería cómo estos receptores serían capaces de acoplar ambos tipos de proteínas G; no obstante, se debería corroborar mediante ensayos GFP-TS. Esta propiedad no es frecuente en los GPCR.

Después de hacer un screening con el fin de aumentar la expresión, donde se mutan diferentes partes del receptor GPR12, no se ha encontrado nada que aumente la expresión, solo la disminuye. Sin embargo, se ha detectado que la N-glicosilación propuesta en una Asn extracelular y el motivo XCXC conservado en esta familia de receptores son cruciales para dicha expresión. Finalmente, es destacable que, aunque en los sistemas de baculovirus se suelen usar células *Thi* para la expresión final, en estos receptores huérfanos sólo se ha conseguido generar virus en cantidades decentes en células *Sf9*.

CONCLUSIONS

The purpose of the present study is the characterization of the human orphan receptors GPR3, 6 and 12, with implication in diseases of the central nervous system. After testing the receptors in various eukaryotic cell lines, functional receptors are obtained with localized expression both in the plasma membrane and intracellular organelles. The constitutive activity of GPR3 and the coupling to G_s protein are confirmed by *in vivo* tests of co-transfection with the receptor and Mini G_{s399} and monitoring the location of the G protein; as well as by *in vitro* tests of simple thermal displacement (GFP-TS). These are the first results not based on cAMP levels. Furthermore, these *in vitro* studies are conclusive since the presence of a possible ubiquitous ligand is reduced. Likewise, co-transfection assays were performed with GPR6 and 12 and were repeated for all receptors with Mini G_{o12} , indicating for the three receptors a constitutive activity and dual coupling to G_{α_s} and $G_{\alpha_{i/o}}$ proteins. There are very few examples of GPCRs capable of coupling both types of G proteins; however, it should be corroborated by GFP-TS assays.

After screening in order to increase receptor expression, where different parts of the GPR12 receptor were mutated, nothing that increased expression was found, only decreased it. Nevertheless, the proposed N-glycosylation in the extracellular Asn8 and the conserved XCXC motif in this family of receptors have been found to be crucial for such expression. Finally, it is noteworthy that, although in baculovirus systems *Thi* cells are commonly used for final expression, in these orphan receptors it has only been possible to generate viruses in decent quantities in *Sf9* cells.

8. BIBLIOGRAFÍA:

1. Santos R, Ursu O, Gaulton A, Bento AP, Donadi RS, Bologa CG, et al. A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;16(1):19–34.
2. Birtwistle J, Baldwin D. Role of dopamine in schizophrenia and Parkinson's disease. *Br J Nurs*. 1998 Jul;7(14):832–41.
3. Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Signalling: Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(9):639–50.
4. Tissue expression of GPR3 - Summary - The Human Protein Atlas [Internet]. [cited 2021 Apr 25]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000181773-GPR3/tissue>
5. Tissue expression of GPR6 - Summary - The Human Protein Atlas [Internet]. [cited 2021 May 18]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000146360-GPR6/tissue>
6. Tissue expression of GPR12 - Summary - The Human Protein Atlas [Internet]. [cited 2021 May 18]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000132975-GPR12/tissue>
7. Tanaka S, Ishii K, Kasai K, Sung OY, Saeki Y. Neural expression of G protein-coupled receptors GPR3, GPR6, and GPR12 up-regulates cyclic AMP levels and promotes neurite outgrowth. *J Biol Chem*. 2007;282(14):10506–15.
8. Thathiah A, Spittaels K, Hoffmann M, Staes M, Cohen A, Horr   K, Vanbrabant M, Coun F, Baekelandt V, Delacourte A, Fischer DF, Pollet D, De Strooper B MP. The Orphan G Protein-Coupled Receptor 3 Modulates Amyloid-Beta Peptide Generation in Neurons. *Sci* 2009 Feb 13; 323(5916) 946-51.
9. Nelson CD, Sheng M. GPR3 Stimulates A β Production via Interactions with APP and β -Arrestin2. *PLoS One*. 2013;8(9).
10. Huang Y, Skwarek-Maruszewska A, Horr   K, Vandewyer E, Wolfs L, Snellinx A, et al. Loss of GPR3 reduces the amyloid plaque burden and improves memory in Alzheimer's disease mouse models. *Sci Transl Med*. 2015;7(309).
11. Benoit ME, Hernandez MX, Dinh ML, Benavente F, Vasquez O, Tenner AJ. C1q-induced LRP1B and GPR6 proteins expressed early in Alzheimer disease mouse models, are essential for C1q-mediated protection against amyloid- β neurotoxicity. *J Biol Chem*. 2013;288(1):654–65.
12. Laun AS, Shrader SH, Brown KJ, Song ZH. GPR3, GPR6, and GPR12 as novel molecular targets: their biological functions and interaction with cannabidiol. *Acta Pharmacol Sin*. 2019;40(3):300–8.
13. Gene: GPR3 (ENSG00000181773) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 103 [Internet]. [cited 2021 Apr 10]. Available from: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000181773;r=1:27392622-27395814;t=ENST00000374024
14. Uhlenbrock K, Gassenhuber H, Kostenis E. Sphingosine 1-phosphate is a ligand of the human gpr3, gpr6 and gpr12 family of constitutively active G protein-coupled receptors. *Cell Signal*. 2002;14(11):941–53.
15. Morales P, Isawi I, Reggio PH. Towards a better understanding of the cannabinoid-related orphan receptors GPR3, GPR6, and GPR12. *Drug Metab Rev*. 2018 Feb;50(1):74-93. doi: 10.1080/03602532.2018.1428616. Epub 2018 Feb 1. Available from: <https://doi.org/10.1080/03602532.2018.1428616>
16. Yin H, Chu A, Li W, Wang B, Shelton F, Otero F, et al. Lipid G protein-coupled receptor ligand identification using β -arrestin PathHunterTM assay. *J Biol Chem*. 2009;284(18):12328–38.

17. Padmanabhan S, Myers AG PB. Constitutively active GPR6 is located in the intracellular compartments. *FEBS Lett.* 2009 Jan 5;583(1):107-12. doi: 10.1016/j.febslet.2008.11.033. Epub 2008 Dec 4. PMID: 19059244. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2008.11.033>
18. Capaldi S, Suku E, Antolini M, Di Giacobbe M, Giorgetti A, Buffelli M. Allosteric sodium binding cavity in GPR3: a novel player in modulation of A β production. *Sci Rep [Internet]*. 2018;8(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-29475-7>
19. Miyagi T, Tanaka S, Hide I, Shirafuji T, Sakai N. The subcellular dynamics of the Gs-linked receptor GPR3 contribute to the local activation of PKA in cerebellar granular neurons. *PLoS One.* 2016;11(1):1–20.
20. Eggerickx D, Deneff JF, Labbe O, Hayashi Y, Refetoff S, Vassart G, et al. Molecular cloning of an orphan G-protein-coupled receptor that constitutively activates adenylate cyclase. *Biochem J.* 1995;309(3):837–43.
21. Bresnick JN, Skynner HA, Chapman KL, Jack AD, Zamiara E, Negulescu P, et al. Identification of signal transduction pathways used by orphan g protein-coupled receptors. *Assay Drug Dev Technol.* 2003;1(2):239–49.
22. Martin AL, Steurer MA, Aronstam RS. Constitutive activity among orphan class-A G protein coupled receptors. *PLoS One.* 2015;10(9):1–12.
23. García-Nafria J, Watson JF, Greger IH. IVA cloning: A single-tube universal cloning system exploiting bacterial In Vivo Assembly. *Sci Rep [Internet]*. 2016;6(June):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep27459>
24. Watson JF, García-Nafria J. In vivo DNA assembly using common laboratory bacteria: A re-emerging tool to simplify molecular cloning. *J Biol Chem.* 2019;294(42):15271–81.
25. Cellfectin™ II Reagent [Internet]. [cited 2021 May 20]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10362100#/10362100>
26. Mirus. flash BAC™ Baculovirus Expression Systems.
27. Veitch NC. Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry.* 2004;65(3):249–59.
28. Nji E, Chatzikyriakidou Y, Landreh M, Drew D. An engineered thermal-shift screen reveals specific lipid preferences of eukaryotic and prokaryotic membrane proteins. *Nat Commun [Internet]*. 2018;9(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-06702-3>
29. Bai N, Roder H, Dickson A, Karanicolas J. Isothermal Analysis of ThermoFluor Data can readily provide Quantitative Binding Affinities. Vol. 9, *Scientific Reports.* 2019.
30. Nehmé R, Carpenter B, Singhal A, Stregé A, Edwards PC, White CF, et al. Mini-G proteins: Novel tools for studying GPCRs in their active conformation The first mini-G protein developed was mini-G s. Here we extend the family of mini-G proteins to include mini-G olf , mini-G il , mini-G ol and the chimeras mini-G s/q and mini-G. *PLoS One [Internet]*. 2017;1–26. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175642.g001>
31. Carpenter B, Tate CG. Engineering a minimal G protein to facilitate crystallisation of G protein-coupled receptors in their active conformation. *Protein Eng Des Sel.* 2016;29(12):583–93.
32. Biología molecular - Proteínas [Internet]. [cited 2021 May 21]. Available from: https://www.ddbiolab.com/data/catalogues_virtuels/ddbiolab/es/0BP/198/
33. Cytiva Columnas preenvasadas para crudos HiTrap™ TALON™. Análisis y cromatografía Productos químicos | Fisher Scientific [Internet]. [cited 2021 May 21]. Available from: <https://www.fishersci.es/shop/products/hitrap-talon-crude-prepacked-columns-5/p-4415925>

34. M. Romero Martos. 2009 [Internet]. [cited 2021 May 21]. Available from: https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/7063/03_Memòria.pdf?sequence=12&isAllowed=y
35. Thermo Scientific™ EZ-Link™ Micro Sulfo-NHS-SS-Biotinylation Kit Kit de biotinilización sulfo-NHS-SS Resinas y kits de biotinilación de aminas | Fisher Scientific [Internet]. [cited 2021 Jun 21]. Available from: <https://www.fishersci.es/shop/products/ez-link-sulfo-nhs-ss-biotin-labeling-kits-1/10055833>
36. Schneider EH, Seifert R. Sf9 cells: A versatile model system to investigate the pharmacological properties of G protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2010;128(3):387–418. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.07.005>
37. Mehlmann LM, Saeki Y, Tanaka S, Brennan TJ, Evsikov A V., Pendola FL, et al. The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. *Science* (80-). 2004;306(5703):1947–50.
38. Roth CB, Hanson MA, Stevens RC. Stabilization of the β 2-adrenergic Receptor 4-3-5 Helix Interface by Mutagenesis of Glu-1223.41, A Critical Residue in GPCR Structure.pdf. 2009;376(5):1305–19.
39. GPR12 - G-protein coupled receptor 12 - Homo sapiens (Human) - GPR12 gene & protein [Internet]. [cited 2021 May 20]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/P47775>
40. Morales P, Hurst DP RP. Methods for the Development of In Silico GPCR Models. *Methods Enzymol*. 2017;593:405-448. 1st ed. Elsevier Inc.;
41. Kobayashi H, Ogawa K, Yao R, Lichtarge O, Bouvier M. Functional rescue of β 1-adrenoceptor dimerization and trafficking by pharmacological chaperones. *Traffic*. 2009;10(8):1019–33.
42. Patricio Atanes Juiz. Estudio de la Funcionalidad de GPCRs mediante el uso de Herramientas Biológicas y Químicas: Aplicación a los receptores 5-HT2A y 5-HT7 de serotonina. *Univ Santiago Compost*. 2013;
43. Hanson MA, Cherezov V, Griffith MT, Roth CB, Jaakola VP, Chien EYT, et al. A Specific Cholesterol Binding Site Is Established by the 2.8 Å Structure of the Human β 2-Adrenergic Receptor. *Structure*. 2008;16(6):897–905.
44. Lancot PM, Leclerc PC, Clément M, Auger-Messier M, Escher E, Leduc R GG. Importance of N-glycosylation positioning for cell-surface expression, targeting, affinity and quality control of the human AT1 receptor. *Biochem J*. 2005 Aug 15;390(Pt 1):367-376. doi: 10.1042/BJ20050189. PMID: 15869468; PMCID: PMC1188272.
45. Yang Z, Yang F, Zhang D, Liu Z, Lin A, Liu C, Xiao P, Yu X SJ. Phosphorylation of G Protein-Coupled Receptors: From the Barcode Hypothesis to the Flute Model. *Mol Pharmacol*. 2017 Sep;92(3):201-210.
46. Mayor F. Mecanismos de regulación de receptores acoplados a proteínas G. *Transducción Señales Como Diana Farm* [Internet]. 1999;41–8. Available from: <https://esteven.org/wp-content/uploads/2018/01/137023.pdf>
47. Sveidahl Johansen O, Ma T, Hansen JB, Markussen LK, Schreiber R, Reverte-Salisa L, et al. Lipolysis drives expression of the constitutively active receptor GPR3 to induce adipose thermogenesis. *Cell*. 2021;3502–18.
48. Richard S, Baltz JM. Preovulatory suppression of mouse oocyte cell volume-regulatory mechanisms is via signalling that is distinct from meiotic arrest. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-00771-y>
49. ExPASy - ProtParam tool [Internet]. [cited 2021 May 24]. Available from: <https://web.expasy.org/protparam/>

9. ANEXOS

01.- Anexo I. Secuencias de los receptores huérfanos GPR3, GPR6 y GPR12.

02.- Anexo II. Aspectos clave en metodología e interpretación de resultados.

03.- Anexo III. Vectores de expresión.

04.- Anexo IV. Diseño de primers.

05.- Anexo V. Alineamiento de secuencia para GPR3, GPR6 y GPR12.

ANEXO I. Secuencias de los receptores huérfanos GPR3, GPR6 y GPR12.

→ GPR3

Secuencia de nucleótidos (sin codón stop):

ATGATGTGGGGGGCTGGGTCTCCACTGGCCTGGCTGTCTGCTGGTAGCGGAAACGTGAAC
GTTAGTTCCGTGGGACCCGCTGAGGGGCCAACGGGCCCAGCAGCGCCTCTCCCTAGTCCC
AAAGCTTGGGACGTCGTGTTGTGCATTTACAGGCACCCTGGTTTCCTGTGAGAACGCCCTTG
TGGTGGCCATTATCGTTGGCACACCAGCGTTTAGGGCCCCTATGTTCTGTCTGTGGGCTC
CCTGGCCGTTGCGGATTTGCTGGCTGGGCTCGGTCTCGTGTGCACTTTGCTGCAGTATTT
TGTATCGGAAGCGCCGAGATGTCCCTCGTGCTCGTGGGCGTGCTTGCTATGGCTTTCACA
GCTTCAATCGGCAGCTTGCTCGCCATTACTGTAGACCGCTACCTGTCCCTGTACAACGCAT
TGACCTACTACTCAGAAACCACAGTCACAAGAACCTACGTAATGCTGGCACTGGTTTGGG
GTGGCGCACTGGGCCTTGGACTTCTTCCCGTGTTGGCCTGGAACGTCTTGATGGGCTCAC
TACCTGTGGAGTTGTCTACCCTTTGAGCAAGAATCATCTGGTAGTGCTCGCCATAGCCTTT
TTTATGGTGTTTCGGGATTATGCTTCAGCTGTATGCCCAAATTTGCAGGATCGTTTGTAGGC
ACGCACAGCAGATTGCTTTGCAGAGGCACCTGCTTCCAGCTAGCCACTATGTGGCGACTC
GGAAAGGCATCGCAACCTTGGCCGTCGTGTTGGGGGCTTTTGCCGCATGCTGGCTGCCCT
TTACGGTGTATTGCCTGCTGGGAGATGCCCATAGTCCCCCTCTTTACACTTATCTGACGCT
CCTGCCTGCGACGTATAACTCCATGATTAATCCTATCATCTACGCCTTCCGGAATCAGGAT
GTACAGAAGGTGCTCTGGGCAGTCTGTTGCTGCTGTAGCTCTTCAAAAATCCCCTTCAGGT
CCCGGAGCCCCTCCGATGTC

Secuencia de aminoácidos:

MMWGAGSPLAWLSAGSGNVNVSSVGPAGPTGPAAPLPSPKAWDVVLCISGTLVSCENALV
VAIIVGTPAFRAPMFLLVGSLAVADLLAGLGLVLHFAAVFCIGSAEMSLVLVGVLAMAFTASI
GSLLAITVDRLSLYNALTYSETTVTRTYVMLALVWGGALGLGLLPVLAWNCLDGLTTCG
VVYPLSKNHLVLAIAFFMVFGIMLQLYAQICRIVCRHAQQIALQRHLLPASHYVATRKGIAT
LAVVLGAFAACWLPFTVYCLLGDASHPPPLYTYLTLLPATYNSMINPIIYAFRNQDVQKVLWA
VCCCCSSSKIPFRSRSPSDV

→ GPR6

Secuencia de nucleótidos (sin codón stop):

ATGAATGCTAGCGCTGCATCCCTGAATGACTCCCAGGTAGTGGTGGTAGCAGCTGAAGGG
GCAGCTGCAGCAGCCACCGCTGCCGGGGGCCCTGACACAGGAGAGTGGGGGCCCCCTGC
CGCGGCGGCTCTTGGTGCCGGCGGAGGGGCCAACGGCAGTCTCGAACTCAGTAGTCAGCT
GTCTGCCGGACCCCCCGTCTCTTGTTCCTGCCGTAAACCCTTGGGATGTCCTTCTGTGC
GTGAGTGGAACGGTTATCGCTGGAGAGAATGCCCTCGTGGTGGCCCTGATCGCATCCACT
CCCGCTCTCCGCACCCCAATGTTCTGTTTGGTGGATCACTGGCGACAGCCGATCTTCTCG
CCGGCTGCGGGGCTCATCTCCACTTCGTGTTCCAATATTTGGTACCGTCCGAAACCGTATC
ACTCTTGACCGTCGGGTTCTTGTGCAAGCTTTGCCGCCTCAGTCAGTTCCTTTTGGCC
ATCACTGTGGACAGATACCTGTCATTGTATAACGCACTTACCTATTACAGCAGAAGGACA
TTGCTGGGCGTCCACCTGCTCCTGGCCGCTACCTGGACCGTGAGTCTGGGGCTCGGACTC
CTTCTGTCTCGGGTGGAACCTGCCTGGCAGAAAGGGCTGCCTGTTCTGTGTGAGGCCC
CTGGCACGCTCTCATGTGGCACTGCTGAGTGCCGCCTTCTTCATGGTCTTTGGGATCATGC
TGCACCTCTACGTTTCGCATTTGCCAGGTGGTGTGGAGGCATGCTCATCAGATAGCCTTGC

AACAGCACTGCCTCGCGCCACCTCATCTGGCGGCTACTCGCAAAGGGGTCCGTACCCTGG
CAGTGGTACTGGGCACCTTTGGGGCTAGTTGGCTGCCTTTCGCCATCTACTGTGTCGTGGG
AAGCCATGAGGACCCCGCCGTCTATACATACGCGACGCTCCTGCCAGCCACATATAACAG
CATGATCAACCCTATAATATATGCATTCCGGAATCAGGAGATCCAGAGAGCCCTGTGGCT
GCTGTTGTGCGGCTGTTTTAGTCTAAAGTGCCTTTCGGTCCCGAAGCCCCAGTGAGGTC

Secuencia de aminoácidos:

MNASAASLND SQVVVAAEGAAAAATAAGGPD TGEWGPPAAAALGAGGGANGSLELSSQL
SAGPPGLLLPAVNPWDVLLCVSGTVIAGENALVVALIASTPALRTPMFVLVGLATADLLAGC
GLILHFVFQYLVPSETVSLTVGFLVASFAASVSSLLAITVDRLSLYNALTYYSRRTLGLVHL
LLAATWTVSLGLLPLVLGWNCLAERAACSVVRPLARSHVALLSAAFFMVFGIMLHLYVRIC
QVWRHAHQIALQQHCLAPPHLAATRKGVTGLAVVLGTFGASWLPFAIYCVVGSHPDPAVY
TYATLLPATYNSMINPIIYAFRNQEIQRALWLLLCGCFQSKVPFRSRSPSEV

→ GPR12

Secuencia de nucleótidos (sin codón stop):

ATGAACGAAGATCTGAAAGTGAATCTCTCCGGTCTTCCCAGGGACTACCTCGATGCGGCT
GCTGCCGAGAACATATCCGCAGCCGTGTCATCTAGAGTTCTTGC GGTTGAGCCCGAGCCA
GAGCTTGTGGTCAATCCCTGGGACATCGTCCTGTGTACATCCGGGACCCTGATCAGTTGC
GAGAACGCGATTGTCGTCCTGATCATATTTACAATCCGTCCCTCCGGGCGCCTATGTTCC
TCCTCATTGGTTCCCTCGCGTTGGCCGATCTGCTGGCCGGCATCGGACTTATAACTAATTT
TGCTTTTGC GTACCTCCTGCAATCTGAGGCCACTAAGCTTGTTACTATCGGACTGATCGTG
GCTTCTTTCTCCGCAAGTGTCTGTTCCCTCCTCGCCATCACCGTGGATCGCTATTTGAGTCT
TTACTATGCCCTCACCTACCATTGAGAGAGAACTGTTACCTTTACGTATGTGATGCTGGTT
ATGCTTTGGGGGACCTCCATCTGCTTGGGACTCCTGCCTGTTATGGGTGGAAGTGTCTGA
GAGACGAGTCCACTTGCAGTGTGGTGAGGCCGCTGACTAAGAATAACGCGGCTATACTCT
CTGTGAGTTTCTTTTCATGTTTCGATTGATGTTGCAATTGTACATCCAGATCTGCAAGAT
CGTGATGCGCCACGCGCACCAATCGCACTGCAGCATCATTTTCTGGCAACAAGTCACTA
TGTGACTACCAGGAAAGGGGTAGCACTCTTGCCATCATCTTGGGTACTTTCGCTGCCTGT
TGGATGCCGTTCACTCTGTATTCCCTGATCGCGGACTACACATATCCATCTATTTACACAT
ACGCCACCCTGCTCCCAGCCACCTACAACAGCATCATAAACCCCGTCATCTATGCCTTCA
GGAACCAGGAGATCCAGAAAGCTCTGTGTCTGATCTGCTGCGGCTGTATTCTAGTAGCC
TTGCACAACGAGCCAGAAGCCCAAGCGACGTG

Secuencia de aminoácidos:

MNEDLKVNLSGLPRDYLDAAAENISA AVSSRP VAVEPEPELVVNPWDIVLCTSGTLISCENA
IVVLIIFHNPSLRAPMFLIGSLALADLLAGIGLITNFVFAYLLQSEATKLVTIGLIVASFASVCS
LLAITVDRLSLYYALTYHSERTVTFTYVMLVMLWGTSICLGLLPVMGWNCLRDESTCSVVR
PLTKNNAAILSVSFLFMFALMLQLYIQICKIVMRHAHQIALQHHFLATSHYVTRKGVSTLAI
LGTFAACWMPFTLYSLIADYTPSIYTYATLLPATYNSIINPVIYAFRNQEIQKALCLICCGCIPS
SLAQRARSPSDV

ANEXO II. Aspectos clave en metodología e interpretación de resultados

Propiedades de los receptores: (49)

→ **GFP-GPR3**

Nº aminoácidos: 612

Peso molecular: 66,5kDa

pI: 6,67

→ **GFP-GPR6**

Nº aminoácidos: 644

Peso molecular: 69,36kDa

pI: 6,46

→ **GFP-GPR12**

Nº aminoácidos: 616

Peso molecular: 68,2kDa

pI: 6,28

Corte con enzimas de restricción:

CONSTRUCTO	BANDAS			
	pBackPak8	pIEX	pCDNA4	pCDNA4 (GPCR sin GFP)
GPR3	5.500, 1500, 354 pb	4.500, 1500, 354 pb	4.516, 1500, 512, 354 pb	4.516, 785, 512, 350 pb
GPR6	5.500, 1.818, 122 pb	4.500, 1.818, 122 pb	4.516, 1.818, 512, 122 pb	4.516, 1.109, 512, 122 pb
GPR12	5.500, 1.112, 754 pb	4.500, 1.112, 754 pb	4.516, 1.112, 754, 512 pb	4.516, 754, 512, 393 pb
GFP-G _s	-	-	4.516, 800, 512, 393, 126, 90, 69 pb	-
GFP-G _o	-	-	4516, 1015, 512, 408 pb	-

Tabla 4. Patrón de bandas al cortar los distintos vectores utilizados en el proyecto con las enzimas de restricción *Bam*HI, *Not*I, *Pst*I y *Nde*I (solo con el vector pCDNA4).

Marcador de peso molecular:

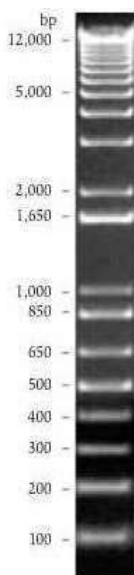


Figura 18. Patrón de bandas del marcador de peso molecular y los pares de bases correspondientes a cada banda.

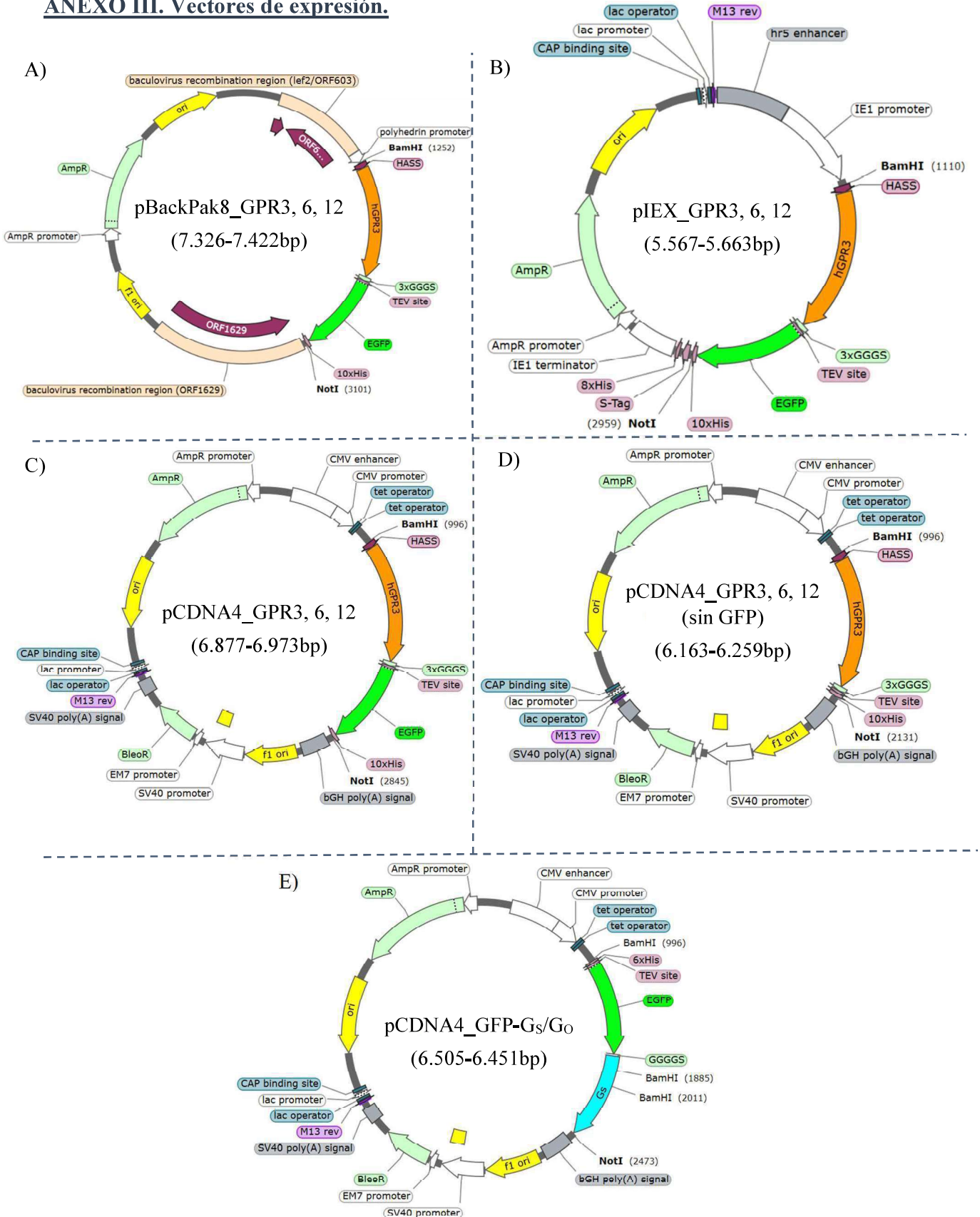
ANEXO III. Vectores de expresión.

Figura 19. Representación esquemática de los distintos vectores de expresión y sus componentes: **A)** pBackPak8, **B)** pIEX, **C)** pCDNA4 con GPR3, 6 y 12 fusionado a GFP; **D)** pCDNA4 con GPR3, 6 y 12 sin GFP; y **E)** pCDNA4 con GFP-G_s/G_o. En las imágenes se representa GPR3, pero es igual para GPR6 y 12, simplemente cambiando el gen de interés por el correspondiente. El tamaño molecular de los vectores oscila entre lo que se indica en la imagen de cada vector correspondiendo el menor tamaño con GPR3 y el mayor con GPR6.

ANEXO IV. Diseño de primers.

Nº	Nombre	Secuencia (5'-3')	Comentario
1	GPR3_Fw	<i>TC TTC TGC CTC GTC TTC GCT</i> ATG TGG GGG GCT GGG TCT C	Insertar GPR3 después de HASS en pBackPak8
2	GPR3_Rv	<i>CAC CAC CAG AAC CGC CAC C</i> GAC ATC GGA GGG GCT CCG	Insertar GPR3 después de HASS en pBackPak8
3	GPR6_Fw	<i>TC TTC TGC CTC GTC TTC GCT</i> AAT GCT AGC GCT GCA TCC C	Insertar GPR6 después de HASS en pBackPak8
4	GPR6_Rv	<i>CAC CAC CAG AAC CGC CAC C</i> GAC CTC ACT GGG GCT TCG G	Insertar GPR6 después de HASS en pBackPak8
5	GPR12_Fw	<i>TTC TGC CTC GTC TTC GCT</i> AAC GAA GAT CTG AAA GTG AAT C	Insertar GPR12 después de HASS en pBackPak8
6	GPR12_Rv	<i>CAC CAC CAG AAC CGC CAC C</i> CAC GTC GCT TGG GCT TCT G	Insertar GPR12 después de HASS en pBackPak8
7	pBackPak8_D3R9_Fw	GGT GGC GGT TCT GGT GGT G	Quitar D3R9 de pBackpak_D3R9
8	pBackPak8_D3R9_Rv	AGC GAA GAC GAG GCA GAA GAT G	Quitar D3R9 de pBackpak_D3R9
9	GPR12_2_Fw	<i>GAC TAT AAG GAT GAC GAC GAC</i> <i>AAA</i> AAC GAA GAT CTG AAA GTG AAT C	Insertar FLAG en GPR12 en pLEX
10	GPR12_2_Rv	<i>GTC GTCGTC ATC CTT ATA GTC</i> AGC GAA GAC GAG GCA GAA G	Insertar FLAG en GPR12 en pLEX
11	GPR12_3_Fw	T TTC TCC GCA AGT GTC TGg TCC CTC CTC GCC ATC ACC GTG	Mutación 3.41W en GPR12 en pLEX
12	GPR12_3_Rv	cCA GAC ACT TGC GGA GAA AGA AGC CAC G	Mutación 3.41W en GPR12 en pLEX
13	GPR12_4_Fw	<i>CTT CTG CCT CGT CTT CGC T</i> CTC TCC GGT CTT CCC AGG G	Deleción Δ-Nter L9 en GPR12 en pLEX
14	GPR12_4, 5, 6, 7, 8_Rv	AGC GAA GAC GAG GCA GAA GAT G	Deleción en GPR12_4, 5, 6, 7, 8 en pLEX
15	GPR12_5_Fw	<i>CTT CTG CCT CGT CTT CGC T</i> ATA TCC GCA GCC GTG TCA TC	Deleción Δ-Nter I25 en GPR12 en pLEX
16	GPR12_6_Fw	<i>CTT CTG CCT CGT CTT CGC T</i> GTT CCT GCG GTT GAG CCC G	Deleción Δ-Nter V33 en GPR12 en pLEX
17	GPR12_7_Fw	<i>CTT CTG CCT CGT CTT CGC T</i> GTG AAT CTC TCC GGT CTT CCC	Deleción Δ-Nter V7 en GPR12 en pLEX
18	GPR12_8_Fw	<i>CTT CTG CCT CGT CTT CGC T</i> GAG AAC ATA TCC GCA GCC GTG	Deleción Δ-Nter E23 en GPR12 en pLEX
19	GPR12_9, 10, 11_Fw	GGT GGC GGT TCT GGT GGT G	Deleción en GPR12_9, 10, 11 en pLEX
20	GPR12_9_Rv	<i>CAC CAG AAC CGC CAC C</i> AAT ACA GCC GCA GCA GAT CAG	Deleción Δ-Cter I320 en GPR12 en pLEX
21	GPR12_10_Rv	<i>CAC CAG AAC CGC CAC C</i> GAT CAG ACA CAG AGC TTT CTGG	Deleción Δ-Cter I315 en GPR12 en pLEX

22	GPR12_11_Rv	<i>CAC CAG AAC CGC CAC C</i> TTG TGC AAG GCT ACT AGG AAT AC	Delección Δ-Cter Q326 en GPR12 en pLEX
23	GPR12_12_Fw	GCT CTG TGT CTG ATC gct TGC GGC TGT ATT CCT AGT AG	Mutación C316A en GPR12 en pLEX
24	GPR12_12_Rv	agc GAT CAG ACA CAG AGC TTT CTG GAT C	Mutación C316A en GPR12 en pLEX
25	GPR12_13_Fw	CTG TGT CTG ATC TGC gct GGC TGT ATT CCT AGT AGC CTT G	Mutación C317A en GPR12 en pLEX
26	GPR12_13_Rv	agc GCA GAT CAG ACA CAG AGC TTT CTG	Mutación C317A en GPR12 en pLEX
27	GPR12_14_Fw	C TGA TCT GCT GCG GC gcT ATT CCT AGT AGC CTT GCA CAA C	Mutación C319A en GPR12 en pLEX
28	GPR12_14_Rv	Agc GCC GCA GCA GAT CAG ACA CAG AG	Mutación C319A en GPR12 en pLEX
29	GPR12_15_Fw	GCC ATC ACC GTG GcT gct TAT TTG AGT CTT TAC TAT GCC C	Mutación DRY-AAY en GPR12 en pLEX
30	GPR12_15_Rv	agc AgC CAC GGT GAT GGC GAG GAG GG	Mutación DRY-AAY en GPR12 en pLEX
31	GPR12_16_Fw	<i>GCT CGC GGA TCC ACC ATG</i> AAC GAA GAT CTG AAA GTG AAT C	Quitar HASS de GPR12 en pLEX
32	GPR12_16_Rv	CAT GGT GGA TCC GCG AGC TCT TG	Quitar HASS de GPR12 en pLEX
33	noGFP_GPR3612_Fw	<i>GAG AAT CTT TAT TTC CAG GGA</i> CAT CAC CAC CAT CAT CAC C	Quitar GFP de GPR3,6,12 en pCDNA4
34	noGFP_GPR3612_Rv	TCC CTG GAA ATA AAG ATT CTC AGA ACC	Quitar GFP de GPR3,6,12 en pCDNA4
35	GFPGs- o_2_pCDNA4_Fw	<i>CTT GGT ACC GAG CTC GGA TCC</i> Δ CCA TGG GTC ACC ACC ATC	Insertar GFP-G _{S/O} en pCDNA4
36	GFPGs_2_pCDNA4_Rv	<i>CTC TAG ACT CGA GCG GCC GC</i> TTA GTA CAA GCC GCA GCC CC	Insertar GFP-G _S en pCDNA4
37	GFPGo_2_pCDNA4_Rv	<i>TCT AGA CTC GAG CGG CCG C</i> TTA GAG CAG CTC GTA CTG ACG	Insertar GFP-G _O en pCDNA4

Tabla 5. Primers utilizados en el proyecto para la construcción de vectores. El color *naranja* indica la secuencia homóloga. Las regiones homólogas se introducen en el extremo 5' de los primers. **tGg** indica mutación del aminoácido, los nt en minúscula han sido mutados y en mayúscula no han sido mutados. Un solo nt **Δ** indica adición. HASS: HA signal sequence. FLAG: secuencia señal.

ANEXO V. Alineamiento de secuencia para GPR3, GPR6, GPR12.

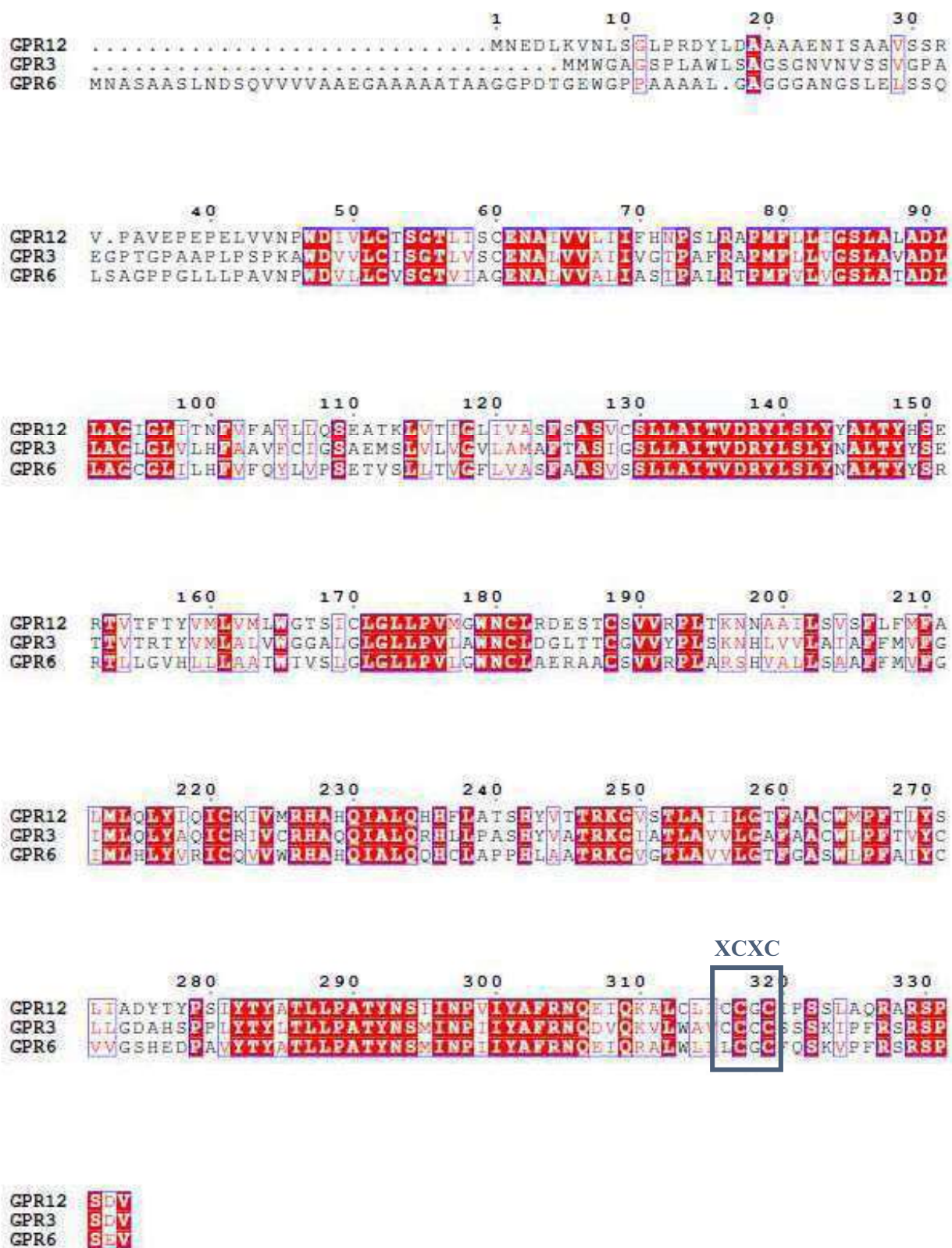


Figura 20. Alineamiento de secuencia de los receptores GPR3, 6 y 12. En el recuadro azul se resalta el motivo XCXC conservado en esta familia.