



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Programa de Magíster en Neurobiología

**Regulación de la expresión de receptores de glicina mediada por la  
activación o inhibición de la proteína quinasa  
dependiente de ciclina 5 (Cdk5)**

Tesis para optar al grado de Magíster en Neurobiología

POR GABRIEL ALBERTO GONZÁLEZ GÓMEZ

Profesor Guía: Dr. Gonzalo Yévenes Crisóstomo

Profesor co-Guía: Dr. Elías Utreras Puratich

Departamento de Fisiología

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

NOVIEMBRE-2023

CONCEPCIÓN-CHILE

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Profesor Guía

---

Dr. Gonzalo Yévenes Crisóstomo  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía

---

Dr. Elías Utreras Puratich  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile

Comisión Evaluadora:

---

Dr. Oscar Cerda A.  
Facultad de Medicina  
Universidad de Chile

---

Dra. Viviana Torres Á.  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dr. Fernando Sepúlveda B.  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Directora subrogante Programa:

---

Dra. Marcela Torrejón Quezada  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

**Tesis financiada por:**

Proyecto Fondecyt 1211082

Núcleo Milenio MINUSPAIN NCN19\_038, ICM

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecer, en primera instancia a mi tutor en esta investigación, el Dr. Gonzalo Yévenes por permitir desarrollarme como científico en su laboratorio, por el tiempo dedicado, paciencia y oportunidades a lo largo de todo este proceso. A mi co-tutor, el Dr. Elías Utreras, por la retroalimentación en las diferentes instancias de presentación y por la disposición a responder consultas.

También quisiera agradecer a mis compañeros del laboratorio de Neurofarmacología (Cesar, Ana, Viki, Oma, Luis, Naty, Vivi, Sofi) por las risas, apoyo, críticas constructivas y la enseñanza de técnicas y procedimientos realizados a lo largo de esta tesis.

A todo el personal técnico y administrativo del departamento de Fisiología (Karina, Jocelin, Don Héctor, Ixia), por el apoyo y la ayuda en todas las actividades realizadas durante esta investigación.

Al Dr. Fernando Bustos (UNAB) por la facilitación de material para la tesis (AVV).

Al Centro de Microscopía Avanzada, CMA Biobío, por la disponibilidad de sus equipos y la enseñanza en la manipulación de estos.

Finalmente quisiera agradecer a mi familia, mis amigos preciosos, roomis, quienes fueron parte importante en mantener mi ánimo arriba para poder finalizar este trabajo.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE TABLAS .....	9
ABREVIATURAS.....	10
RESUMEN.....	12
ABSTRACT .....	14
INTRODUCCIÓN .....	16
1. Aspectos generales de la proteína quinasa Cdk5 y su activador p35 .....	16
2. Proceso de activación de la señalización mediada por Cdk5.....	19
3. Hiperactivación/desregulación de Cdk5 .....	22
4. Canales iónicos modulados por Cdk5 .....	24
5. Aspectos generales de los receptores de glicina (RGLi) .....	28
6. Fosforilación de receptores de glicina por proteínas quinasas .....	33
HIPÓTESIS .....	38
OBJETIVO GENERAL .....	38
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	38
METODOLOGÍA .....	40
1. Amplificación de plásmidos .....	40
1.1 Transformación de bacterias .....	40
1.2 Amplificación de Bacterias.....	40
1.3 Purificación de plásmidos .....	41
2. Expresión de las subunidades $\alpha 1$ , $\beta$ del RGLi y de p35 en células HEK293 .....	41
2.1 Cultivo celular .....	41
2.2 Plásmidos .....	41
2.3 Transfección.....	44
2.4 Ensayos con Roscovitina .....	45
3. Tratamientos en cultivos primarios de neuronas espinales .....	47

3.1 Cultivos primarios de neuronas espinales .....	47
3.2 Experimentos de sobreactivación/inhibición de Cdk5 en cultivos primarios espinales	48
4. Inmunofluorescencia .....	49
4.1 Inmunofluorescencia en células HEK293 .....	49
4.2 Inmunofluorescencia en cultivos primarios de médula espinal .....	50
4.3 Anticuerpos utilizados.....	51
4.4 Análisis de expresión relativa a través de imágenes confocales .....	51
5. Análisis estadísticos .....	52
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>54</b>
1.- Efectos de la activación Cdk5 en la expresión de RGli compuestos de subunidades $\alpha 1$ ....	54
2.- Efectos de la activación Cdk5 en la expresión de RGli compuestos de subunidades $\alpha 1$ y $\beta$ . .....	56
3.- Efectos de la activación Cdk5 en la expresión de RGli compuestos de subunidades $\alpha 2/3$ y $\beta$ . .....	66
4.- Efectos de la activación e inhibición de Cdk5 sobre la expresión de RGli nativos en cultivos primarios de neuronas espinales .....	70
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>77</b>
Modulación de RGli de conformaciones $\alpha 1$ , $\alpha 1\beta$ , $\alpha 2\beta$ , y $\alpha 3\beta$ por la activación de Cdk5 en células HEK293 .....	78
Estudio de la modulación de RGli nativo por Cdk5 en cultivos primarios espinales. ....	83
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>87</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>88</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procesos celulares regulados por Cdk5. ....	18
Figura 2. Vías intracelulares involucradas en la activación de Cdk5. ....	21
Figura 3. Estructura y conformación del RGlI. ....	29
Figura 4. Sitios de fosforilación putativos para Cdk5 en el dominio intracelular del RGlI. ....	36
Figura 5. Representación de principales plásmidos utilizados. ....	43
Figura 6. Condiciones de transfección utilizadas para la realización de experimentos. ....	46
Figura 7. La activación de Cdk5 no produce alteraciones significativas en la expresión de $\alpha 1$ -RGlI. ....	56
Figura 8. La activación de Cdk5 resulta en un aumento en la expresión de RGlI heteropentámero en la superficie celular. ....	59
Figura 9. La activación de Cdk5 resulta en un aumento en la expresión total de RGlI heteropentámeros. ....	61
Figura 10. Expresión de p35 en células HEK293 co-transfectadas. ....	62
Figura 11. Roscovitina atenúa el aumento en la expresión de $\alpha 1\beta$ -RGlI producido al activar Cdk5. ....	65
Figura 12. La activación de Cdk5 resulta en un aumento en la expresión total de $\alpha 2\beta$ -RGlI heteropentámeros. ....	68
Figura 13. La activación de Cdk5 no modula la expresión de $\alpha 3\beta$ -RGlI heteropentámeros. ....	70
Figura 14. La activación de Cdk5 resulta en una disminución de la expresión de RGlI en cultivos primarios de neuronas espinales. ....	73
Figura 15. La inhibición de Cdk5 no afecta la expresión de RGlI en cultivos primarios de neuronas espinales. ....	76



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Plásmidos utilizados en la realización de la tesis. ....	42
Tabla 2. Cantidades de plásmido utilizadas en la transfección de células HEK293.....	45

## ABREVIATURAS

Cdk5 .....	Quinasa dependiente de ciclina 5
MTs .....	Microtúbulos
MAPs.....	Proteínas asociadas a microtúbulos
AD .....	Enfermedad de Alzheimer
PD.....	Enfermedad de Parkinson
ROS .....	Especies reactivas del Oxígeno
HD .....	Enfermedad de Huntington
MSNs.....	Neuronas espinosas medianas del cuerpo estriado
HTT .....	Proteína huntingtina
LTP.....	Potenciación a largo plazo
RGli .....	Receptor de Glicina
TRPV1.....	Receptor de potencial transitorio V1
NMDA.....	N-metil-D-asparto
P2X2.....	Receptor purinérgico P2X2
AMPA .....	ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
CaV2.2.....	Canal de calcio voltaje dependiente de tipo N
GABA.....	ácido $\gamma$ -aminobutírico
nAChR.....	Receptor nicotínico de acetilcolina
5-HT3 .....	Receptor de serotonina tipo 3.
pLGICs .....	Canales iónicos pentaméricos activados por ligando
DEC .....	Dominio extracelular

DTM.....Dominio transmembrana  
DIC ..... Dominio intracelular  
IL ..... Loop intracelular  
CRMP2.....Proteína 2 mediadora de respuesta a colapsina  
PKC .....Proteína quinasa C  
PKA ..... Proteína quinasa A  
PTK .....Proteína Tirosina quinasa  
CaMKII ..... Calcio calmodulina quinasa 2  
ERK.....Quinasa regulada por señales extracelulares  
GFP..... Proteína fluorescente verde  
AVV ..... Virus adenoasociado  
MIPs ..... Proyecciones de máxima intensidad  
IPSCs..... Corrientes postsinápticas inhibitorias  
aa ..... Aminoacido

## RESUMEN

La quinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5) es una enzima que fosforila residuos de serina o treonina dirigidos por prolina. Cdk5 participa en diferentes etapas del desarrollo del sistema nervioso y está mayoritariamente activa en neuronas post-mitóticas, debido a la alta expresión de sus activadores p35 y p39. Estudios anteriores han reportado que Cdk5 puede modificar la actividad de canales iónicos y receptores neuronales mediante fosforilación. Sin embargo, la posibilidad de que Cdk5 module los receptores inhibitorios de glicina (RGlis) aún no ha sido explorada. Los RGlis pertenecen a la familia de canales iónicos activados por ligando y median la entrada del ion cloruro a la neurona, generando una hiperpolarización del potencial de membrana y un control efectivo de la excitabilidad neuronal. Estudios preliminares de nuestro grupo indican que en el dominio intracelular de las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\beta$  de RGli hay potenciales sitios consenso de fosforilación mediada por Cdk5. Estos análisis mostraron que la subunidad  $\beta$  posee un sitio de consenso canónico para fosforilación por Cdk5 ( $^{391}\text{TPVH}$ ), mientras que la subunidad  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  solo posee un motivo mínimo de serina/treonina guiada por prolina ( $^{408}\text{SP}$  y  $^{392}\text{TP}$  respectivamente). A través de ensayos de inmunofluorescencia, se analizó el efecto de la activación o inhibición de Cdk5 sobre la expresión y localización subcelular de los RGli recombinantes (de configuración  $\alpha 1$ ,  $\alpha 1\beta$ ,  $\alpha 2\beta$ ,  $\alpha 3\beta$ ) así como RGli nativos en cultivos primarios de neuronas espinales. Nuestros análisis mostraron que la activación de Cdk5 no afecta la expresión de RGli recombinantes compuestos por la subunidad  $\alpha 1$  y  $\alpha 3\beta$ . De manera contraria, se observó un

aumento significativo (del 33%) en la expresión los RGli heteroméricos ( $\alpha 1\beta$  o  $\alpha 2\beta$ ) al activar Cdk5 mediante la sobreexpresión de p35 en células HEK293. Por otro lado, al analizar la inhibición de Cdk5 con roscovitina (30  $\mu$ M), este aumento de expresión se ve bloqueado. Los estudios en cultivos primarios espinales mostraron que, la activación de Cdk5 disminuye la expresión de RGli (50%). Sin embargo, al inhibir la actividad de esta quinasa, no se observaron variaciones en la expresión de este receptor. En resumen, nuestros resultados indican que la expresión y localización de los RGli heteroméricos ( $\alpha 1\beta$  o  $\alpha 2\beta$ ) podrían ser regulados por Cdk5, probablemente mediante fosforilación de la subunidad  $\beta$ , lo que podría tener implicancias importantes en el control glicinérgico de la excitabilidad neuronal.

## ABSTRACT

Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) phosphorylates proline-directed serine or threonine residues. Cdk5 participates in different stages of nervous system development and is mainly active in post-mitotic neurons, due to the high expression of its p35 and p39 activators. Previous studies have reported that Cdk5 can modify the activity of ion channels and neuronal receptors through phosphorylation. However, the possibility that Cdk5 modulates inhibitory glycine receptors (GlyRs) has not yet been explored. GlyRs belong to the family of ligand-gated ion channels and mediate chloride ion entry into the neuron, generating a hyperpolarization of the membrane potential and effective control of neuronal excitability. Preliminary studies from our group indicate that in the intracellular domain of the  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , and  $\beta$  subunits of GlyR, there are potential consensus phosphorylation sites mediated by Cdk5. These analyses showed that the  $\beta$  subunit has a canonical consensus site for Cdk5 phosphorylation ( $^{391}\text{TPVH}$ ), while the  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  subunits only have a minimal proline-directed serine/threonine motif ( $^{408}\text{SP}$  and  $^{392}\text{TP}$ , respectively). Through immunofluorescence assays, the effect of Cdk5 activation or inhibition on the expression and subcellular localization of recombinant GlyRs ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 1\beta$ ,  $\alpha 2\beta$ ,  $\alpha 3\beta$ ) as well as native GlyRs in primary spinal neuron cultures was analyzed. Our analyses showed that Cdk5 activation does not affect the expression of recombinant GlyRs composed of the  $\alpha 1$  and  $\alpha 3\beta$  subunits. In contrast, a significant increase (of 33%) in the expression of heteromeric GlyRs ( $\alpha 1\beta$  or  $\alpha 2\beta$ ) was observed when Cdk5 was activated by overexpressing p35 in HEK293 cells. On the other hand, when

Cdk5 was inhibited with roscovitina (30  $\mu$ M), this increase in expression was blocked. Studies in primary spinal cultures showed that Cdk5 activation decreases GlyR expression (50%). However, inhibiting the activity of this kinase did not lead to any variations in receptor expression. In summary, our results suggest that the expression and subcellular localization of heteromeric GlyRs ( $\alpha$ 1 $\beta$  or  $\alpha$ 2 $\beta$ ) may be regulated by Cdk5, possibly through phosphorylation of the  $\beta$  subunit, which could have significant implications for the glycinergic control of neuronal excitability.

## INTRODUCCIÓN

### 1. Aspectos generales de la proteína quinasa Cdk5 y su activador p35

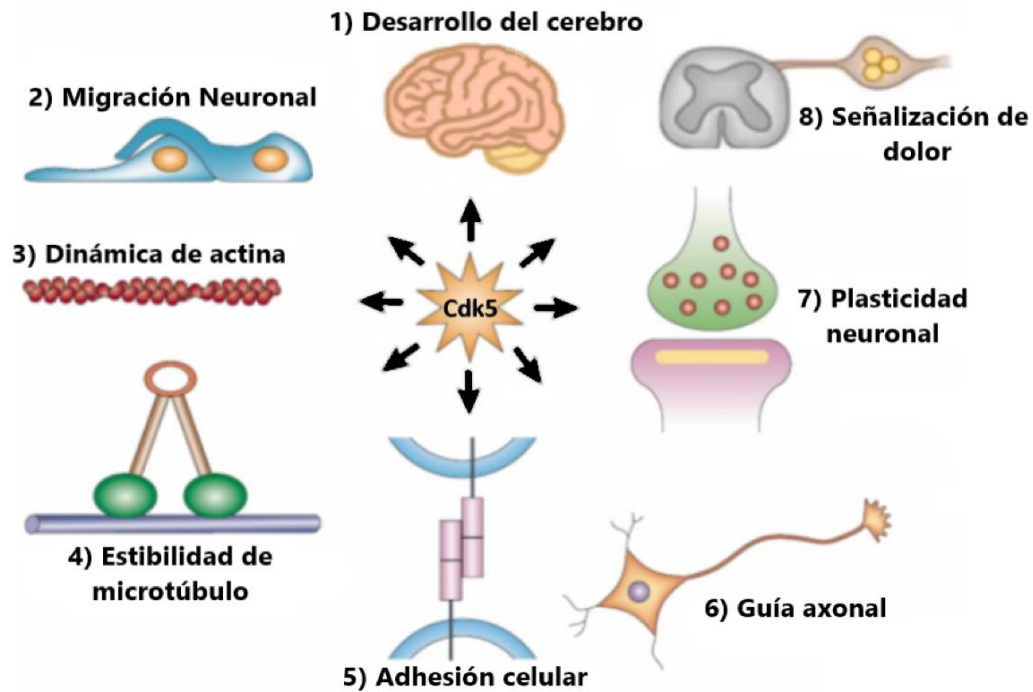
La proteína quinasa dependiente de cíclica 5 (Cdk5) pertenece a la familia de quinasas dependientes de ciclinas (Cdks), las cuales fosforilan residuos de serina o de treonina dirigidos por prolina en la secuencia consenso (S/T)PX(K/H/R) (Borquez et al., 2013). En este contexto, Cdk5 se asoció a esta familia de proteínas por su 60% de homología con Cdk1 (Meyerson et al., 1992). La mayoría de las Cdks participan activamente en la regulación de las diferentes etapas del ciclo celular (Hellmich et al., 1992). De manera particular Cdk1 aumenta su actividad en la etapa S del ciclo celular por lo cual, en un comienzo se pensó que Cdk5 también participaba en esta etapa del ciclo celular (Enserink et al., 2010; Su & Tsai, 2011). Sin embargo, a diferencia de Cdk1, la actividad de Cdk5 no se ha asociado directamente a la regulación del ciclo celular (Lopes & Agostinho, 2011). Diversos estudios han determinado un rol fundamental de Cdk5 en el desarrollo y función del cerebro, regulando principalmente procesos de desarrollo, sobrevivencia, migración, neurotransmisión y plasticidad en neuronas post-mitóticas (**Figura 1**) (Shah & Lahiri, 2014).

La relevancia fisiológica de Cdk5 ha sido demostrada principalmente en ratones deficientes para esta quinasa, los cuales mueren en estados perinatales por deficiencias en su desarrollo cerebral (Ohshima et al., 1996; Ko et al., 2001). Por otra parte, la hiper-activación de Cdk5 se ha asociado a



alteraciones en la sinapsis y a procesos de muerte neuronal en diferentes enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer (AD), la enfermedad de Parkinson (PD) y la enfermedad de Huntington (HD) (Allnut et al., 2020).

Cdk5 se expresa ubicuamente en células de mamíferos (Pao & Tsai, 2021), aunque está mayormente activa en neuronas tanto del sistema nervioso periférico como central (Pao & Tsai, 2021). A diferencia de otros miembros de la familia de las Cdks, esta proteína no es regulada por la actividad de una ciclina y tampoco requiere de fosforilación en su sitio de activación para promover su actividad quinasa (Tarricone et al., 2001). La actividad de Cdk5 es regulada por la unión de sus activadores neuronales p35 o p39, y sus respectivas formas clivadas p25 o p29 (Shah & Rossie, 2017). La unión de estos activadores con Cdk5 es suficiente para la activación de la quinasa (Saito, 2003).



**Figura 1. Procesos celulares regulados por Cdk5.** Cdk5 está involucrada en diferentes procesos relacionados al desarrollo cerebral (1), tales como la migración (2,3) a través de la fosforilación de diferentes proteínas de unión a actina (ABP) (Shah & Rossie, 2017). También modula la estabilidad de los microtúbulos (4), donde a partir de la fosforilación de diferentes proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) controla la polimerización o disociación de los heterodímeros ( $\alpha/\beta$ -tubulina) que forman los microtúbulos. Por otra parte, Cdk5 (5,6) inhibe la adhesión celular al fosforilar  $\beta$ -catenina evitando la formación de complejos con N-cadherina, disminuyendo la adhesión entre células. De modo interesante, Cdk5 (7,8) participa como un regulador de la sinapsis y de procesamiento nociceptivo a partir de la fosforilación de

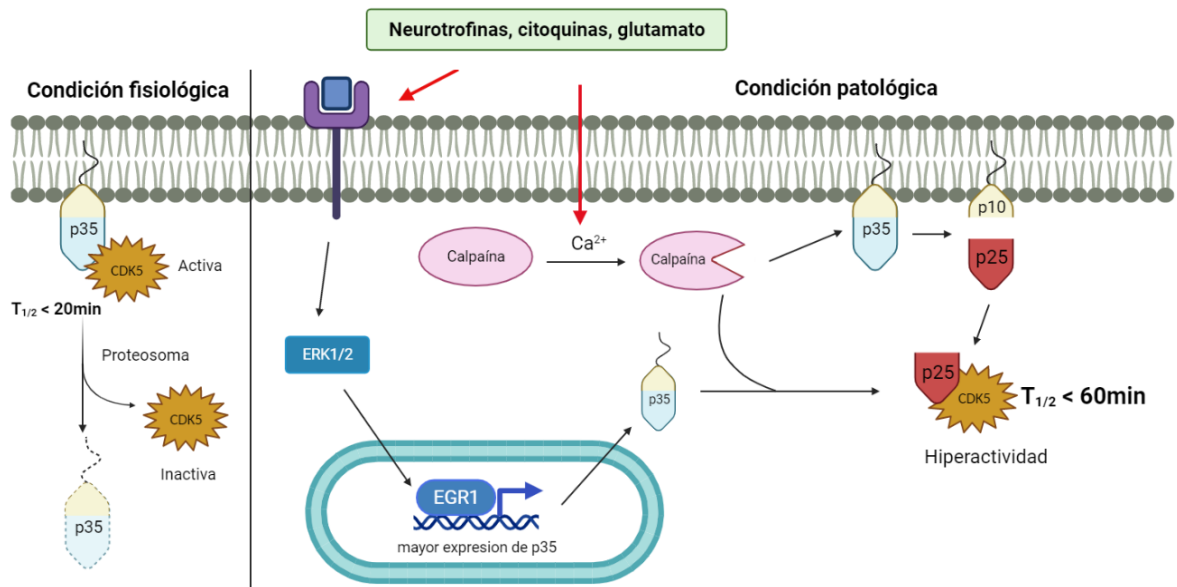
diferentes canales iónicos, tales como TRPV1, NMDA, P2X2 y canales de calcio. (Imagen modificada de Su & Tsai, 2011)

## **2. Proceso de activación de la señalización mediada por Cdk5**

Las proteínas activadoras p35 y p39 poseen una estructura terciaria similar a las ciclinas, lo que les permite activar a Cdk5 (Tarricone et al., 2001). La formación del complejo Cdk5-p35, en situaciones fisiológicas, está autorregulada por la degradación de p35 (Kusakawa et al., 2000). Este evento ocurre como consecuencia de la fosforilación de p35 por Cdk5, lo que genera una señal de ubiquitinación y su posterior degradación mediada por el proteosoma (Patrick et al., 1998). A nivel celular, la expresión de p35 es menor a la de Cdk5, por lo que es ampliamente aceptado que los niveles de p35 son el determinante principal de la actividad de esta quinasa (Kusakawa et al., 2000).

Un aumento en señales extracelulares y la consiguiente activación desregulada de diferentes vías de señalización y receptores de membrana, tales como receptores de neurotrofinas, de citoquinas y el neurotransmisor glutamato, promueven un aumento en la expresión de p35 y la activación de la enzima calpaína (Gomez et al., 2020). Principalmente esta cascada de señalización promoverá la actividad de la quinasa ERK1/2 induciendo la expresión y activación del factor de transcripción EGR1, el cual se une al promotor de p35 y por ende aumenta la expresión de p35 (Shah & Lahiri, 2014). El proceso de activación de calpaína es gatillado por la entrada de calcio a la célula a través de canales iónicos (Kusakawa et al., 2000).

Calpaína es una proteasa dependiente de calcio que se encuentra como proenzima en el citoplasma (Saito, 2003). En su forma activa, esta proteasa corta p35 o p39 produciendo los fragmentos p25 o p29 respectivamente, siendo estos fragmentos más estables que la proteína completa, llegando a tener una vida media 5 veces mayor (Kusakawa et al., 2000). Además, p25 no sufre ubiquitinación, por lo que tiene mayor resistencia a la proteólisis (Patrick et al., 1998). Por otra parte, p35 se encuentra anclada a la membrana por modificaciones post-traduccionales, sin embargo, al ser clivada, su dominio N-terminal queda libre en el citoplasma, provocando un cambio en la localización de Cdk5 activada (Saito. et al, 2003). Así, el complejo Cdk5-p35 se encuentra principalmente anclado a la membrana, mientras que el complejo Cdk5-p25 se ha detectado mayormente en el citoplasma y/o cercano al núcleo (Chang et al., 2011). Así, p25 genera una activación sostenida de Cdk5 en el tiempo (Peterson et al., 2010) (**Figura 2**).



**Figura 2. Vías intracelulares involucradas en la activación de Cdk5.**

Diferentes moléculas como neurotrofinas (NGF, BDNF, GDNF), citoquinas (TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , IL-6) y neurotransmisores (glutamato), activan vías de señalización (ERK1/2 y PI3K) que inducirán un aumento de p35, promoviendo la activación de Cdk5. Un aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular activará a calpaína, induciendo el clivaje proteolítico de p35 y formando p25, una proteína más estable que promoverá la activación sostenida de Cdk5. Este estado de hiperactivación de Cdk5 facilitará la fosforilación de sus diferentes sustratos, tales como canales iónicos o receptores. (Imagen modificada de Shah & Lahiri, 2014; Allnut et al., 2020; Gomez et al., 2020)

### **3. Hiperactivación/desregulación de Cdk5**

Como se menciona anteriormente, la actividad de Cdk5 está mayormente regulada por la expresión de p35 (Kusakawa et al., 2000). Un aumento en la expresión de esta proteína o su clivaje a p25 produce una hiperactividad de Cdk5 y su deslocalización de la membrana promoviendo una fosforilación desregulada de diferentes sustratos (Chang et al., 2011). Cdk5 puede modular, por ejemplo, la dinámica de los microtúbulos (MTs), participando activamente en su polimerización o despolimerización (Allnut et al., 2020). Esta dinámica está regulada por proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs), las cuales interactúan con estas estructuras estabilizándolas o desestabilizándolas (Su & Tsai, 2011). Un ejemplo de esta modulación es fosforilación de la proteína tau por Cdk5 (Shah & Lahiri, 2014). La proteína Tau es una MAPs encargada de la estabilización de MTs tanto en los axones como en las dendritas (Kapitein & Hoogenraad, 2015). Una fosforilación de Tau mediada por Cdk5 promoverá una menor unión entre Tau y MTs, produciendo la agregación de Tau y la formación de agregados de esta proteína hasta ovillos neurofibrilares. Estas estructuras promueven la muerte neuronal en regiones cerebrales, una característica principal en la enfermedad de Alzheimer (AD) (Allnut et al., 2020).

Por otro lado, diversos estudios han asociado a Cdk5 con la enfermedad de Parkinson (PD) (Avraham et al., 2007; Zhang et al., 2016). Esta enfermedad se caracteriza por la muerte de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra. Uno de los gatillantes de la muerte neuronal es una disfunción en la mitocondria y el aumento de especies reactivas del oxígeno

(ROS) (Hwang et al 2013). Producto de lo anterior se producirá una desregulación del calcio intracelular promoviendo la actividad de calpaínas (Smith et al., 2006). La actividad de esta proteasa promoverá el clivaje de p35 a p25 y por consiguiente una hiperactividad de Cdk5 (Dhavan & Tsai, 2001). Una de las vías de acción de Cdk5 es la fosforilación de la peroxidasa peroxiredoxinas (Prx2), donde la fosforilación en treonina 89 reduce la actividad de Prx2, aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y por consiguiente produce muerte neuronal (Qu et al., 2007). Por otro lado, la inhibición de la actividad de Cdk5 previene la muerte neuronal en modelos de PD de ratón (He et al., 2018)

En el contexto de enfermedades neurodegenerativas, la enfermedad de Huntington (HD) también está caracterizada por la pérdida de un tipo de población neuronal, específicamente neuronas espinosas medianas del cuerpo estriado (MSNs) (McColgan & Tabrizi, 2018). En este contexto, un aumento en la actividad de calpaínas promueve la agregación de fragmentos tóxicos de la proteína huntingtina (HTT) (Liman et al., 2014). Por otro lado, la fosforilación de HTT en serina 434 por acción de Cdk5 produce una disminución en la agregación de los fragmentos de HTT (Allnut et al., 2020). En esta línea, la fosforilación de la Serina 1181 y 1201 de HTT por Cdk5 también previene la toxicidad asociada a la agregación de esta proteína y la muerte neuronal (Pao & Tsai, 2021).

En resumen, la actividad de Cdk5 se puede asociar con diferentes enfermedades neurodegenerativas actuando de diferente manera, como por ejemplo en las enfermedades de AD y PD, esta quinasa promueve la muerte

neuronal y por ende la progresión de la enfermedad, mientras en HD una fosforilación mediada por Cdk5 funciones protectoras (Allnut et al., 2020). En este contexto, Cdk5 también participa activamente en la regulación de otras enfermedades de alta incidencia en la población como el dolor crónico, donde su actividad esta mayormente ligada a la modulación tanto en función como expresión y localización de diferentes canales iónicos (Utreras et al., 2009; Gomez et al., 2020).

#### **4. Canales iónicos modulados por Cdk5**

Uno de los principales grupos de sustratos de Cdk5 son receptores y canales iónicos implicados en la transmisión nerviosa (Pao & Tsai, 2021). Diferentes investigaciones han reportado que la fosforilación mediada por Cdk5 de residuos específicos regula la actividad de canales iónicos del sistema nervioso central y periférico (Kwok-on & Nancy, 2009; Liu et al., 2015; Gomez et al., 2020; Cheng et al., 2022). Un ejemplo destacado es la fosforilación del receptor TRPV1 vía Cdk5 (Pareek et al, 2007). Los TRPV1 son canales iónicos termosensibles altamente expresados en neuronas sensoriales (Wang, 2018). Temperaturas mayores a 42°C activan este canal, generando un influjo de  $Ca^{+2}$  al interior celular, produciendo una despolarización que permite activar las vías neuronales que procesan la información sensorial de temperatura nociceptiva (Caterina et al., 2001). Estudios bioquímicos realizados en neuronas sensoriales y en modelos recombinantes de TRPV1 han reportado que el residuo de treonina 407 (T407) de este receptor es sustrato para la actividad de Cdk5 (Pareek et al.,



2007). Otros estudios realizados por Liu y su grupo demostraron que Cdk5 juega un papel crucial en el tráfico de este receptor a la membrana, donde la activación de esta quinasa aumenta la expresión de este receptor en la membrana, mas no su nivel de proteína total (Xing et al., 2012; Liu et al., 2015). Por otro lado, análisis funcionales indican que la fosforilación mediada por Cdk5 de TRPV1 incrementa la función del canal (Rozas et al., 2016). En contexto de dolor inflamatorio, se observó que la fosforilación de TRPV1 mediada por Cdk5 produjo una hipersensibilidad a estímulos térmicos nociceptivos en ratones (Pareek et al., 2007; Rozas et al., 2016).

Los receptores de glutamato NMDA y AMPA también han sido identificados como sustratos de Cdk5 (Li et al., 2001). Estos receptores están formando tetrámeros de las subunidades GluN1 con GluN2(A-D) o GluN3(A-B), para el caso de los receptores NMDA, y GluA1-4 para el caso de los receptores AMPA (Kwok-on & Nancy, 2009; Gomez et al., 2020; Cheng et al., 2022). El glutamato es el mayor neurotransmisor excitatorio del SNC promoviendo el influjo de  $Ca^{2+}$  y  $Na^{+}$ , resultando en la despolarización de la membrana generando potenciales excitatorios (Bourinet et al., 2014). Estos receptores están ampliamente expresados en el sistema nervioso central y participan tanto de la comunicación sináptica basal como de procesos de plasticidad sináptica (Xia et al., 2001). La subunidad GluN2A del receptor NMDA es fosforilada en el residuo de serina 1232 (S1232) produciendo un aumento de función de receptores NMDA recombinantes en células HEK293, aumento que no es posible observar al mutar S1232 por alanina (Wang et al., 2003). Al estudiar la fosforilación en receptores NMDA recombinantes en células HEK293 se observa un aumento de función del

canal en comparación al receptor mutado en S1232A. En el caso de los receptores AMPA, se ha reportado que Cdk5 modula la expresión de estos receptores en membrana de manera indirecta (Cheng et al., 2022). CRMP2 es una proteína asociada mayormente al crecimiento de neuritas, sin embargo, participa activamente en el tráfico de canales iónicos (Brittain et al., 2009). Esta proteína posee, en su N-terminal, distintos sitios de fosforilación, siendo el residuo serina 522 (S522) fosforilado por Cdk5 (Moutal et al., 2019). CRMP2 promueve un aumento en la expresión citoplasmática de la subunidad GluA1 de los receptores AMPA, sin embargo, la fosforilación por Cdk5 reduce la expresión en membrana de estos receptores (Cheng et al., 2022).

Al igual que los receptores AMPA, los canales Cav2.2 también modifican su función indirectamente a través de la fosforilación de la proteína CRMP2 por Cdk5 (Brittain et al., 2011). La expresión de este canal está presente en neuronas tanto del SNP como del SNC, de manera predominante en terminales sinápticos y espinas dendríticas (Westenbroek et al., 1992). Estos canales están compuestos por 4 o 5 subunidades distintas, donde la subunidad  $\alpha$  es la encargada de dar las características funcionales del canal y subunidades auxiliares que darán diferentes propiedades en expresión y biofísicas (Dolphin, 2016). La fosforilación mediada por Cdk5 de la proteína CRMP2 produce un aumento en su afinidad por el canal de calcio Cav2.2, promoviendo el tráfico de este a la membrana, aumentando su expresión y por consiguiente un mayor influjo de  $\text{Ca}^{+2}$  y una mayor excitabilidad neuronal (Joel et al., 2012; Moutal et al., 2016). De manera contraria, la fosforilación de la subunidad  $\alpha$  del canal Cav2.1 disminuye su actividad al

inhibir su interacción con el complejo SNARE, evitando así la liberación de neurotransmisores (Tomizawa et al., 2002).

Cdk5 también es capaz de fosforilar los receptores purinérgicos P2X2R (Coddou et al., 2017). Este es un receptor abundantemente expresado en SNC y SNP (Illes et al., 2021). P2X2 es activado por ATP extracelular y su apertura permite el flujo de cationes a la célula (Illes et al., 2021). Estudios *in vitro* indican que la activación de Cdk5 produce un aumento en los niveles de P2XR fosforilado sin cambiar los niveles de expresión del receptor (Nair et al., 2010). Estudios funcionales de la actividad de P2X2 demostraron que al activar Cdk5 hubo una disminución en la desensibilización del canal, sugiriendo una modulación de su actividad mediada por Cdk5 (Coddou et al., 2017).

Los antecedentes presentados aquí muestran que Cdk5 posee una función fisiológica en la maduración y desarrollo de sistema nervioso. A su vez, la inhibición de la actividad de Cdk5 produce, la muerte de ratones a partir de malformaciones cerebrales. Por otro lado, Cdk5 puede actuar de manera patológica en diferentes enfermedades neurológicas como AD, PD y HD. Cdk5 también está implicada en las vías de señalización del dolor, regulando la transmisión sináptica lo que provoca despolarización de la membrana plasmática con el subsecuente aumento de la actividad neuronal, lo que gatilla la señalización de dolor. En este aspecto, los efectos de Cdk5 se han estudiado mayormente sobre canales iónicos excitatorios. Sin embargo, a la fecha se desconoce si la actividad de Cdk5 modula canales

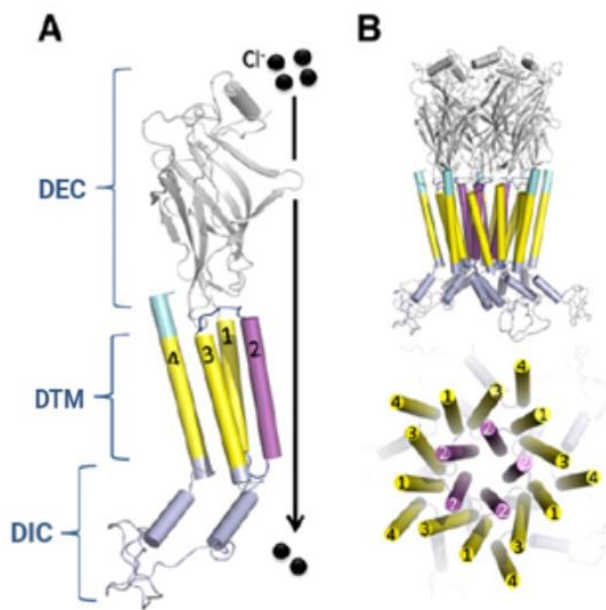
iónicos inhibitorios, tales como los receptores de glicina o los receptores de GABA del tipo A.

## **5. Aspectos generales de los receptores de glicina (RGli)**

La glicina, junto con el GABA, son los neurotransmisores liberados en las sinapsis inhibitorias a lo largo del sistema nervioso. Al unirse a sus respectivos receptores ionotrópicos permiten el paso del ion cloruro al interior de la neurona, generando una hiperpolarización del potencial de membrana y un control efectivo de la excitabilidad neuronal (Aprison, 1990; Dutertre et al., 2012; Zeilhofer et al., 2018; Kasaragod & Schindelin, 2018). Los RGli, junto con los receptores de GABA<sub>A</sub>, receptores 5-HT<sub>3</sub> y nAChR forman parte de la familia de canales iónicos activados por ligando pentaméricos (pLGICs) (daCosta & Baenziger, 2013). Los miembros de esta familia tienen estructuras altamente conservadas, y son distinguibles principalmente por la presencia de dos puentes disulfuro formado por cuatro residuos de cisteína en su N-terminal (Jaiteh et al., 2016). Los RGli están formados por cinco subunidades organizadas alrededor de un poro permeable a aniones (Breitinger & Becker, 2002). Cuando glicina se une al receptor se produce una apertura de este poro, permitiendo el paso de cloruro, hiperpolarizando el potencial de membrana (Lynch, 2004).

La estructura de cada subunidad del RGli consta de 3 dominios principales: el dominio extracelular (DEC), los dominios de transmembrana (DTM, del 1 al 4) y el intracelular (DIC) entre los DTM 3 y 4 (**Figura 3**) (Burgos et al., 2016). En el DEC es donde se encuentran los elementos

necesarios para la unión del ligando, mientras que los DTM son fundamentales para formar la estructura del poro que permite el paso selectivo de aniones (Nemecz et al., 2016). Por otra parte, el DIC tiene influencia en la conductancia del canal y en la asociación del receptor a estructuras del citoesqueleto (Choi & Ko, 2015; Breitinger et al., 2018; Moraga-Cid et al., 2020). Además, el DIC representa el principal sitio de modificaciones postraduccionales, como por ejemplo la fosforilación (Ivica et al., 2021).



### Figura 3. Estructura y conformación del RGLi.

En (A) se muestra una representación de los diferentes dominios de una subunidad del RGLi. DEC en gris, DTMs en amarillo. Se destaca el DTM 2 en morado, el cual forma el poro del canal. El DIC se muestran en gris (IL). En (B) se muestra la configuración pentamérica del RGLi y como los diferentes dominios están distribuidos. En la figura inferior se puede apreciar la formación del poro aniónico mediante la asociación de los dominios DTM2

(Modificado de Burgos et al., 2016).

Se han identificado cinco subunidades del RGLi en vertebrados, cuatro subunidades  $\alpha$  (1-4) y una  $\beta$  (Burgos et al., 2016). Sin embargo, en el genoma

humano sólo se expresan los genes para las subunidades  $\alpha$  (1-3) y  $\beta$  (*GLRA1*, *GLRA2*, *GLRA3*, *GLRB*) (Zeilhofer et al., 2018; Davies et al., 2010). También se han identificado variantes de *splicing* alternativo de las subunidades  $\alpha$ :  $\alpha 1$  ( $\alpha 1$  -  $\alpha 1$ ins),  $\alpha 2$  ( $\alpha 2A$  -  $\alpha 2B$ ) y  $\alpha 3$  ( $\alpha 3K$  -  $\alpha 3L$ ) (Webb & Lynch, 2007; Zhang et al., 2019).

Los RGli pueden estar compuestos de 5 subunidades  $\alpha$  (homopentámeros) o de 4 subunidades  $\alpha$  y 1  $\beta$  (heteropentámeros) (Lynch, 2004). La subunidad  $\alpha$  es crítica para el funcionamiento del canal, debido a que el sitio de unión a ligando se encuentra en el DEC, en la interfase de dos subunidades  $\alpha$  (Lynch, 2009). A la subunidad  $\beta$  se le asocia tradicionalmente un rol estructural, ya que interacciona con la proteína de anclaje postsináptica gefirina (Breitinger & Becker, 2002). Gefirina actúa como puente entre RGli y filamentos de actina del citoesqueleto, produciendo la formación agrupaciones de estos receptores en la región postsináptica (Kirsch et al., 1995). Así, gefirina también es utilizado como un indicador positivo que sugiere la presencia de RGli sinápticos (Choi & Ko, 2015).

La expresión de las diferentes subunidades  $\alpha$  de los RGli varía en las diferentes etapas del desarrollo del SNC (Salceda, 2022). Los niveles de expresión de la subunidad  $\alpha 2$  son altos en estado prenatal y disminuyen postnatalmente, de manera contraria las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 3$ , las cuales aumentan su expresión postnatalmente (Watanabe & Akagi, 1995). De manera similar, la expresión de la subunidad  $\beta$  es mayor en etapas tardías del desarrollo embrionario y en estados postnatales (Weltzien et al., 2012). En adultos, las subunidades  $\alpha 1$  están altamente expresadas en la médula espinal, tronco encefálico, mesencéfalo, y zonas específicas del cerebro, mientras que

la subunidad  $\alpha 3$  se encuentra mayormente en las láminas 1 y 2 de la asta dorsal en la médula espinal (Harvey et al., 2004; Webb & Lynch, 2007). Por otra parte, la subunidad  $\beta$  está expresada ampliamente en el sistema nervioso (Imboden et al., 2001).

La estequiometría de los RGli heteropentaméricos no estaba completamente definida, dado que existían evidencias de la formación de complejos de estequiometría  $3\alpha 2\beta$  y/o  $2\alpha 3\beta$  (Durisic et al., 2012). Sin embargo, estudios cristalográficos recientes han demostrado que sólo RGli heteroméricos con una estequiometría  $4\alpha 1\beta$  presentan conductancia similar a la de RGli nativos, mientras que RGli con un mayor número de subunidades  $\beta$  no genera canales funcionales (Yu et al., 2021; Zhu & Gouaux, 2021). Dado que solo los RGli conformados por la subunidad  $\beta$  pueden unirse a la proteína de andamiaje gefirina (Specht et al., 2013), los RGli heteropentaméricos de estequiometría  $4\alpha 1\beta$  son los RGli mayormente expresados en las sinapsis del sistema nervioso de mamíferos (Maric et al., 2017).

Se han identificado sinapsis inhibitorias mediadas por los RGli en el SNC, principalmente en la médula espinal, tronco encefálico, así como también en la retina (Werman et al., 1967; Chery et al., 1999; Mitchell et al., 2007; Wässle et al., 2009, Dutertre et al., 2012, Gamlin et al., 2018). La importancia fisiológica de la subunidad  $\alpha 1$  en el control global de la excitabilidad neuronal ha sido demostrada con la generación de ratones deficientes para  $\alpha 1$  RGli, los cuales no sobreviven las dos semanas postnatales (Kling et al., 1997). Además, mutaciones en  $\alpha 1$  RGli causan un desorden neurológico denominado hiperekplexia o enfermedad del

sobresalto, el cual se caracteriza por fallas en el control motor debido a estímulos sorpresivos (Langlhofer & Villmann., 2016).

La subunidad  $\alpha 2$  de RGLi se asocia principalmente con la sinaptogénesis y la migración de interneuronas por su mayor expresión en esta etapa del desarrollo (Chen et al., 2022). Por ejemplo, estudios en murinos mostraron la importancia de esta subunidad en la formación correcta de fotorreceptores en la retina (Haverkamp et al., 2004). Además, en ratones deficientes de esta subunidad se observó microcefalia en ratones recién nacidos y un aumento en las ramificaciones de las dendritas, promoviendo un incremento en la excitabilidad neuronal y haciéndolos más susceptibles a tener ataques de epilepsia (Zhang et al., 2015a). También en estos ratones se observaron problemas de memoria y motores, además de problemas en la potenciación a largo plazo (LTP) (Morelli et al., 2017). Por otra parte, meta-análisis y estudios funcionales han identificado mutaciones en la subunidad  $\alpha 2$  que se han asociado al trastorno del espectro autista (ASD) (Pilorge et al., 2016).

La subunidad  $\alpha 3$  se ha asociado mayormente al procesamiento sensorial en las láminas superficiales de la médula espinal (Lynch et al., 2017). En ratones deficientes de la subunidad  $\alpha 3$  se demostró su importante función en el procesamiento nociceptivo (Harvey et al., 2004). Estudios de comportamiento con modelos de dolor crónico de origen inflamatorio demostraron que ratones deficientes en  $\alpha 3$  presentan una recuperación acelerada a la hipersensibilidad a estímulos térmicos y mecánicos comparados con ratones de tipo silvestre, mostrando de ese modo que la señalización glicinérgica mediada por  $\alpha 3$  RGLi tiene un papel importante en



fenómenos de dolor crónico de origen inflamatorio (Harvey et al., 2004). Esta subunidad también se encuentra expresada en el hipocampo de forma extrasináptica (Aroeira et al., 2011). La expresión de la variante GlyR $\alpha$ 3L<sup>P185L</sup> gatilla comportamientos similares a la ansiedad a partir de un aumento de la función de este canal, promoviendo una desregulación en la excitabilidad derivando en síntomas psiquiátricos (Winkelmann et al., 2014).

Los RGLis sinápticos se encuentran agrupados a partir de la interacción con la subunidad  $\beta$  y con la proteína gefirina (Kirsch et al., 1995). La subunidad  $\beta$  esta expresada en todo el SNC modulando las sinapsis inhibitorias a partir de la formación de agrupaciones de receptores (“*clusters*”) (Lynch, 2009). Una disrupción en esta interacción promoverá la difusión de RGLis en la membrana y disminuirá la presencia de RGLis sinápticos (Specht et al., 2011). Al igual que la subunidad  $\alpha$ 1, para la subunidad  $\beta$  también se ha reportado la presencia de mutaciones en pacientes con hiperekplexia (James et al., 2013). En este aspecto mutaciones como R450X, Y470C, P169L en la subunidad  $\beta$  disminuyen la expresión en membrana de estos receptores, sin embargo, la expresión total de la subunidad no se ve afectada (Chung et al., 2012).

## **6. Fosforilación de receptores de glicina por proteínas quinasas**

Uno de los principales mecanismos de regulación de la función y localización de los canales iónicos es la fosforilación (Kumar et al., 2010). Aunque las subunidades  $\alpha$  del RGLi poseen una alta identidad (80%) entre ellas, la mayor diferencia se encuentra en el dominio intracelular, lugar donde

ocurren modificaciones postraduccionales (Langhofer & Villmann., 2016). En este contexto, diversos estudios han mostrado que la fosforilación del dominio intracelular del RGLi altera su función, y expresión y distribución en la membrana (Moss & Smart, 1996; Meyer et al., 1995; Specht et al., 2011; Talwar & Lynch, 2014; Moraga-Cid et al., 2020; Breitinger & Breitinger, 2020, San Martin et al., 2022). La activación de proteína quinasa C (PKC), proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA), proteína tirosina quinasa (PTK), proteína calcio calmodulina quinasa II (CaMKII), así como también la proteína quinasa regulada por señales extracelulares (ERK1/2), se han reportado como moduladoras del RGLi en diversos modelos experimentales (Wang et al, 1995; Caraiscos et al., 2002; Breitinger et al., 2018; Zhang et al., 2019).

PKC fosforila la subunidad  $\alpha 1$  en serina 389 (Lynch, 2004) y a la subunidad  $\beta$  en serina 403 (Specht et al., 2011). Estudios previos han mostrado que la activación de PKC produce cambios en la sensibilidad a glicina de  $\alpha 1$  y  $\alpha 1\beta$  RGLi (Breitinger et al., 2018). Estudios funcionales reportaron que la acción de PKC produce un aumento en el  $EC_{50}$  del RGLi expresados en células HEK293, reduciendo la amplitud de las corrientes evocadas por glicina (Breitinger et al., 2018). Además, la fosforilación en el aminoácido S403 de la subunidad  $\beta$  incrementó la difusión del receptor en la membrana, disminuyendo la presencia de RGLi en la post-sinapsis (Specht et al., 2011).

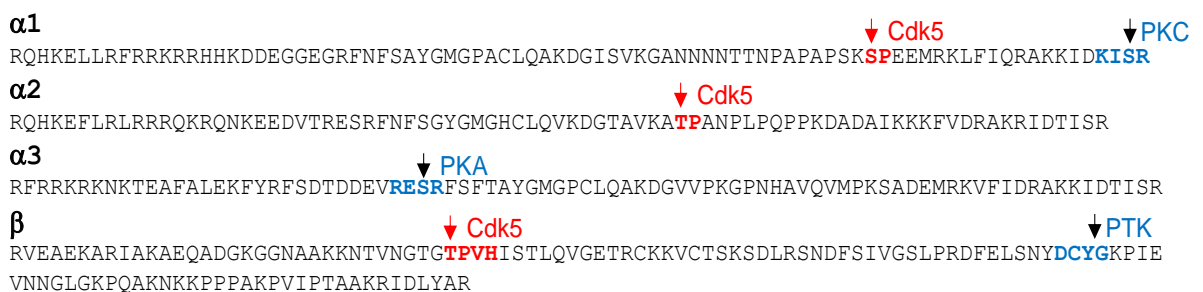
A diferencia de PKC, la subunidad  $\alpha 1$  no tiene un sitio consenso de fosforilación para PKA. Por el contrario,  $\alpha 3$  posee un sitio consenso de fosforilación para PKA en la serina 346 (Harvey et al, 2004). Estudios

iniciales determinaron que la fosforilación RGli por PKA potencia la corriente activada por glicina (Vaello et al., 1994), mientras que investigaciones posteriores demostraron que la fosforilación en  $\alpha 3$ -RGli por PKA disminuye la corriente activada por glicina debido a una reducción de la conductancia del canal iónico (Harvey et al., 2004; Moraga-Cid et al., 2020). Sin embargo, una subunidad  $\alpha 1$  generada a partir de *splicing* alternativo, que contiene una inserción de 8 aminoácidos en su región intracelular ( $\alpha 1$ ins), posee un sitio de fosforilación que posiblemente estaría siendo fosforilada por PKA (Malosio et al., 1991).

Investigaciones recientes demostraron además la existencia de un sitio consenso de fosforilación para ERK en la subunidad  $\alpha 1$ ins de RGli (Zhang et al., 2019). Estudios previos en cultivos celulares y neuronales mostraron que la fosforilación de esta subunidad por ERK provocó una disminución de la amplitud de las corrientes evocadas por glicina (Zhang et al., 2019). Finalmente, otros reportes han demostrado que la PKT y que la CaMKII son capaces de modular a RGli (Wang & Randic, 1996; Carraicos et al, 2002). En el caso de PTK, se identificó un sitio consenso (Y413) dentro del dominio intracelular de la subunidad  $\beta$ , cuya fosforilación aumentó la función y la desensibilización de RGli (Carraicos et al, 2002). De modo similar, estudios en cultivos primarios de neuronas espinales mostraron que la actividad de CaMKII incrementó la corriente de cloruro mediada por glicina (Wang & Randic, 1996).

En conjunto, estos reportes confirman que el DIC del RGli es un sustrato importante para varias proteínas quinasas. Sin embargo, a la fecha se desconoce si los RGli pueden ser modulados por fosforilación vía Cdk5.

Como un primer paso para resolver esta pregunta, nuestro grupo de investigación, en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Elías Utreras (U. Chile), identificó sitios putativos consenso de fosforilación por Cdk5 en diferentes subunidades del RGlI (**Figura 4**). De modo interesante, utilizando el servidor Phosphosite Plus ([www.phosphosite.org](http://www.phosphosite.org)), encontramos que el sitio de fosforilación putativo canónico en la subunidad  $\beta$  de RGlI (TPVH) ha sido detectado en su conformación fosforilada en estudios de caracterización masiva de proteínas a través de técnicas de High-Throughput Sequencing (HTS) (Wiśniewski et al., 2010; Lundby et al., 2012). A su vez, encontramos sitios de consenso mínimos (SP o TP) en la subunidad  $\alpha 1$ ins y en la subunidad  $\alpha 2$  (**Figura 4**). De modo interesante, un reporte reciente ha mostrado que la secuencia SP de  $\alpha 1$ ins es fosforilada por la quinasa ERK (Zhang et al., 2019).



**Figura 4. Sitios de fosforilación putativos para Cdk5 en el dominio intracelular del RGlI.** Análisis de las estructuras de las diferentes subunidades muestran posibles sitios de fosforilación para Cdk5, marcados en rojo. En azul se muestran sitios de fosforilación previamente estudiados.

La existencia de sitios putativos de Cdk5 en diferentes subunidades de RGl<sub>i</sub> permite sugerir que la expresión, la distribución y la función de estos canales iónicos pudiera ser controlada por Cdk5. En base a los estudios publicados (Breitinger et al., 2018; Zhang et al., 2019; Moraga-Cid et al., 2020) la fosforilación de RGl<sub>i</sub> por Cdk5 podría gatillar cambios conformacionales que podrían modular su localización en la sinapsis o en la membrana plasmática, así como también sus características funcionales. Este trabajo de tesis pretendió evaluar la potencial modulación de la localización y expresión de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\beta$  del RGl<sub>i</sub> en condiciones de activación o inhibición de Cdk5.

## **HIPÓTESIS**

Estudios previos han determinado que la activación de Cdk5 modula varios canales iónicos presentes en el sistema nervioso de mamíferos. A la fecha, se desconoce si los RGLi son modulados por Cdk5. Nuestros análisis de secuencia primaria muestran que las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\beta$  presentan secuencias consenso que potencialmente pudieran ser fosforilados por Cdk5. En base a estos antecedentes, se propone la siguiente hipótesis de trabajo:

*La expresión y distribución de los receptores de glicina son regulados por la proteína quinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5).*

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar si la expresión y distribución subcelular de los receptores de glicina es alterada por la activación o la inhibición de Cdk5.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Determinar los efectos de la activación de Cdk5 sobre la expresión y distribución de los receptores de glicina  $\alpha 1$  homoméricos recombinantes expresados en células HEK293 mediante inmunocitoquímica.

2. Determinar los efectos de la activación o inhibición de Cdk5 sobre la expresión y distribución subcelular de los receptores de glicina  $\alpha 1\beta$  recombinantes expresados en células HEK293 mediante inmunocitoquímica.
3. Determinar los efectos de la activación de Cdk5 sobre la expresión y distribución subcelular de los receptores de glicina  $\alpha 2\beta$  y  $\alpha 3\beta$  recombinantes expresados en células HEK293 mediante inmunocitoquímica.
4. Determinar los efectos de la activación o inhibición de Cdk5 en la distribución de los receptores de glicina neuronales mediante inmunocitoquímica.

En líneas generales, este trabajo estudió la expresión de los RGli homo y heteropentaméricos mediante la transfección transitoria en células HEK293 en condiciones de activación e inhibición de Cdk5. Además, evaluamos la expresión de los RGli nativos en cultivos primarios de neuronas espinales utilizando técnicas de inmunocitoquímica. La activación de Cdk5 fue inducida a partir de la expresión de p35, mientras que la inhibición fue estudiada mediante el uso del inhibidor roscovitina.

## METODOLOGÍA

### 1. Amplificación de plásmidos

#### 1.1 Transformación de bacterias

Los plásmidos requeridos para los experimentos se transformaron bacterias *E. coli* XL Blue quimiocompetentes. La transformación se trabajó bajo mechero. Primero, se mezclaron 0.2  $\mu$ L de plásmido con 50  $\mu$ L de *E. coli* XL Blue quimiocompetentes en un tubo eppendorf y se dejaron incubando 15 min. Pasado el tiempo, el volumen completo se agregó a una placa de medio agar/LB, la cual tenía el antibiótico correspondiente a la resistencia para cada plásmido, para sembrar así las bacterias. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C, para luego a la mañana siguiente ser selladas con Parafilm y guardadas en un refrigerador a 4°C hasta su uso.

#### 1.2 Amplificación de Bacterias

Luego de la obtención de colonias de *E. coli* XL Blue quimiocompetentes aisladas, se seleccionó una de estas utilizando un asa plástica, para ser traspasada a un tubo estéril con 15 ml medio de cultivo LB con el antibiótico respectivo. Posteriormente, la colonia se incubó a 37°C en agitación (150-170 rpm) durante toda la noche.



### 1.3 Purificación de plásmidos

Al día siguiente, después de obtener una turbidez en el medio, se procedió a extraer y purificar el ADN a partir del cultivo bacteriano mediante la utilización del kit E.Z.N.A® Plasmid Mini Kit II (Omega BIO-TEK, USA) para finalmente cuantificar la concentración y pureza de los plásmidos obtenidos utilizando NanoQuant Infinite M200PRO (TECAN, USA) en su configuración de ADN doble hebra.

## 2. Expresión de las subunidades $\alpha 1$ , $\beta$ del RGlI y de p35 en células HEK293

### 2.1 Cultivo celular

Las células HEK293 (CRL-1573; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) fueron cultivadas utilizando métodos estándar (Lara et al., 2019). El método de transfección utilizado se presenta en la sección 2.3. Los experimentos se hicieron 24 h luego de la transfección.

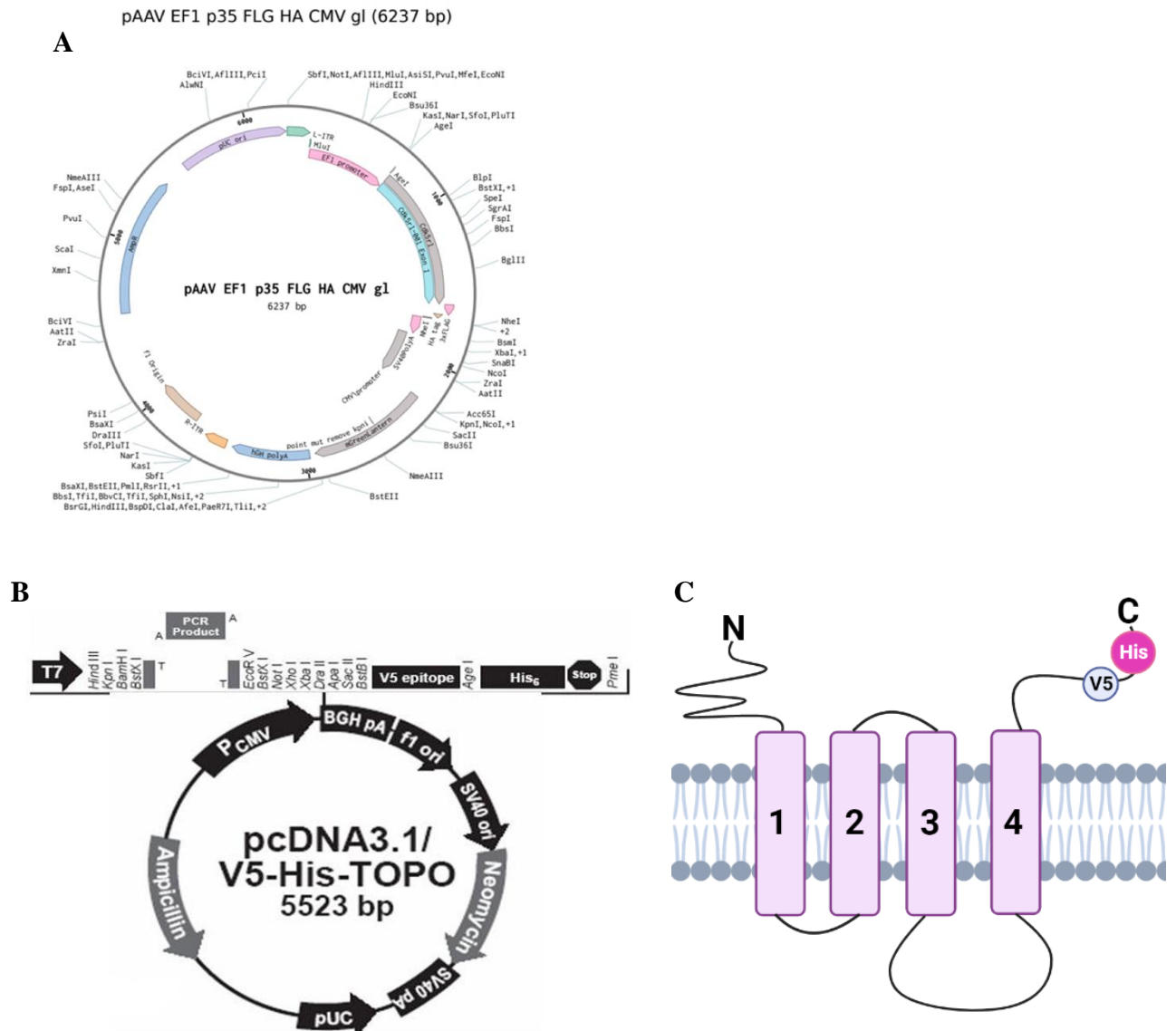
### 2.2 Plásmidos

Los plásmidos utilizados en esta investigación se presentan en la siguiente tabla:

Gen	Vector
RGlI $\alpha 1$ -WT (“Wild-type”)	pCI

RGli $\alpha$ 1-V5-His-TOPO	pcDNA3.1
RGli $\alpha$ 2-WT (“Wild-type”)	pCI
RGli $\alpha$ 3-WT (“Wild-type”)	pCI
RGli $\beta$ -V5-His-TOPO	pcDNA3.1
p35/EGFP	pAAV-EF1-FLG-HA-CMV-EGFP
EGFP	pGreenLantern

**Tabla 1. Plásmidos utilizados en la realización de la tesis.**



**Figura 5. Representación de principales plásmidos utilizados.**

(A) Representación del plásmido utilizado para la expresión de p35/EGFP y sus respectivos promotores (EF1 para p35 y CMV para EGFP). (B) Representación del plásmido utilizado para la expresión de las subunidades  $\alpha$ 1-His o  $\beta$ -His. (C) Esquema de una subunidad de RGLi donde se muestran los dominios transmembrana y el respectivo epítipo de Hexa-Histidina utilizado para el marcaje de cada subunidad.

## 2.3 Transfección

Las células fueron transfectadas utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA). Los estudios de inmunofluorescencia se realizaron en placas de 24 pocillos. Para los ensayos con receptores homoméricos se transfectaron 400 ng de plásmido que codifica para RGLi  $\alpha 1$ , los cuales fueron agregados a un tubo eppendorf con 100  $\mu\text{L}$  de Opti-MEM® I (1x) (Invitrogen, USA), mientras en otro tubo eppendorf fueron agregados 0.8  $\mu\text{L}$  de lipofectamina 2000 con 100  $\mu\text{L}$  de Opti-MEM®. Se adicionó la solución con el ADN sobre la solución que contiene la lipofectamina y se incubó 10 min la mezcla a temperatura ambiente. A cada pocillo se le retiraron 100  $\mu\text{l}$  previo a agregar los 200  $\mu\text{l}$  de la mezcla resultante, la cual se agregó gota a gota, de forma directa, sobre el medio de cultivo con las células. En los experimentos de inmunofluorescencia con receptores heteroméricos  $\alpha 1\beta$ -RGLi,  $\alpha 2\beta$ -RGLi y  $\alpha 3\beta$ -RGLi el protocolo fue el mismo, sin embargo, los plásmidos que codifican para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  fueron transfectados en una proporción 1:5 respectivamente para favorecer la formación de receptores heteropentaméricos (Muñoz et al., 2021).

Tanto para la transfección de  $\alpha 1$ ,  $\alpha 1\beta$ ,  $\alpha 2\beta$  o  $\alpha 3\beta$ , se utilizó GFP como marcador positivo de transfección y como condición control. Para estudiar los efectos de la activación de Cdk5, células HEK293 fueron transfectadas con los RGLi de interés y con el vector p35/GFP

Para los experimentos de purificación de proteínas se utilizaron placas de 10 cm respectivamente. La cantidad de plásmido a transfectar en estas placas se determinó estableciendo una relación en base a los diámetros de los

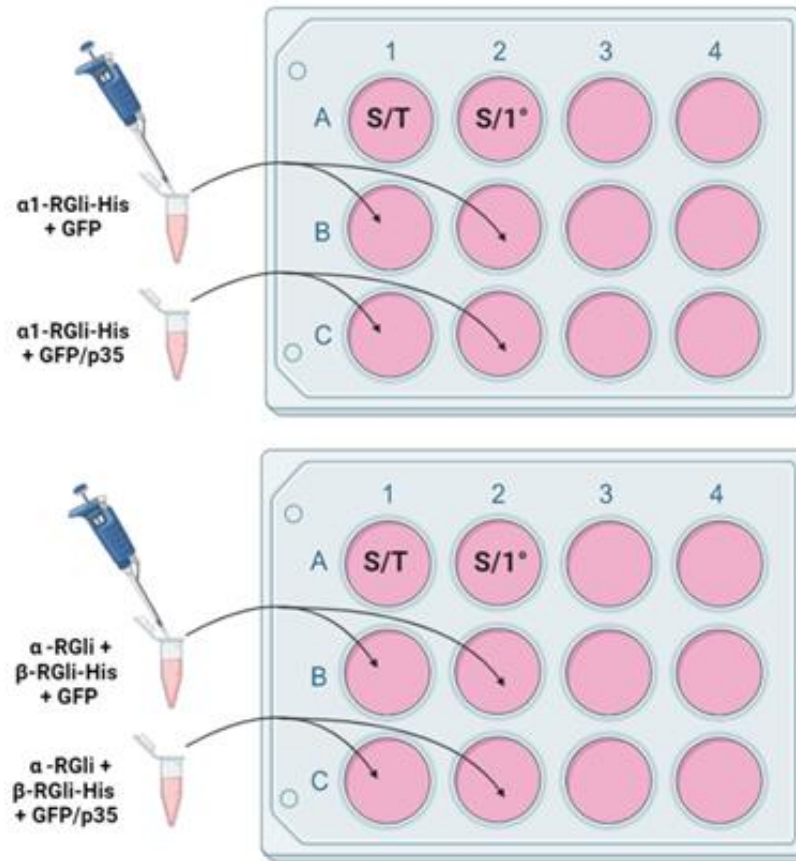
pocillos/placas, de manera que en todas las placas tuvieran una cantidad de proporcional de células transfectadas.

	<b>Configuración</b>	<b>Subunidad <math>\alpha</math> (1, 2, 3)</b>	<b>Subunidad <math>\beta</math></b>	<b>GFP o GFP/p35</b>
<b>Placa 24 pocillos</b>	$\alpha 1$	400 ng	-	400 ng
	$\alpha 1\beta$	300 ng	1200 ng	400 ng
	$\alpha 2\beta$	400 ng	1600 ng	600 ng
	$\alpha 3\beta$	400 ng	1600 ng	600 ng
<b>Placa 10 cm</b>	$\alpha 1\beta$	1000 ng	4000 ng	1000 ng

**Tabla 2. Cantidades de plásmido utilizadas en la transfección de células HEK293.**

## **2.4 Ensayos con Roscovitina**

Para evaluar los efectos del bloqueo de la actividad quinasa de Cdk5 en las células HEK293 transfectadas, se utilizó el inhibidor comercial roscovitina (AK Scientific, California). Luego de 12 h de transfección, las células fueron incubadas con roscovitina (30  $\mu$ M) por 12 h (Coddou et al., 2017). Para ello se descartó el medio de cultivo y se agregó medio nuevo con roscovitina a la concentración de trabajo. Los ensayos se realizaron 12 h posteriores a este tratamiento.



**Figura 6. Condiciones de transfección utilizadas para la realización de experimentos.** De manera inicial se trabajó con la subunidad  $\alpha 1$ -RGLi la cual se marca mediante un epítotope de His. Luego se trabajó con las diferentes subunidades  $\alpha$  (1-3) “WT” de RGLi y la subunidad  $\beta$  era la marcada con un epítotope de His. S/T = sin transfectar, S/1° = sin anticuerpo primario.

### **3. Tratamientos en cultivos primarios de neuronas espinales**

#### **3.1 Cultivos primarios de neuronas espinales**

Se utilizaron ratones wild-type C57BL/J6 o transgénicos VGAT::CHR2-EYFP (Zhao et al., 2011). Los ratones fueron mantenidos en cajas en grupos de 2 a 4, en un ciclo de 12 h de luz/oscuridad, con agua y comida *ad libitum*. Para la realización de los cultivos primarios de médula espinal se utilizaron embriones de ratón de 13.5 de gestación (E13.5).

Los cultivos de médula espinal fueron preparados siguiendo protocolos anteriormente descritos (Lara et al., 2016; Yévenes et al., 2003). Se realizó la eutanasia de una hembra preñada mediante la inhalación de CO<sub>2</sub> y posterior dislocación cervical. Luego se realizó inmediatamente la remoción de los embriones (E13.5), los cuales fueron decapitados para proceder a la disección de la médula espinal. El tejido de la médula espinal fue triturado mecánica y enzimáticamente (tripsina 0.25%; Merck) para luego ser sembrado a una confluencia de 320.000 células/vidrio, en vidrios de 18 mm de diámetro (Placa de 12 pocillos), o con una confluencia de 160.000 células /vidrio, en vidrios de 12 mm de diámetro (placa de 24 pocillos) tratados previamente con poly-lysine (Sigma #P4707). Las células sembradas se mantuvieron en medio plating, el cual contiene MEM/EBBS (Hyclone®, #SH30244.02) suplementado con 10% suero de caballo (Gibco #26050-088), 1% glutamina (Gibco #25030-081) y 1% DNase I (Roche, #11284932001) a 37°C en una atmosfera saturada de H<sub>2</sub>O y 5% CO<sub>2</sub>. Luego de 24 h de la siembra, se reemplazó el medio plating por el doble de volumen de medio feeding

(MEM/EBBS suplementado con 4% suero fetal bovino (Gibco #16000-044), 4% suero de caballo (Gibco #26050-088) y 0.4% de una mezcla de nutrientes y factores de crecimiento. Los cultivos fueron incubados a 37°C en una atmosfera saturada de H<sub>2</sub>O y 5% CO<sub>2</sub> hasta su utilización a los 14 – 21 días de maduración.

Los protocolos que se utilizan en esta investigación para el cuidado animal y la experimentación se rigen por los establecidos por el NIH (National Institutes of Health, Maryland, EEUU), además se cumplió con los protocolos éticos establecidos, y fueron supervisados, por el Comité de Bioética y Bioseguridad de la Universidad de Concepción.

### **3.2 Experimentos de sobreactivación/inhibición de Cdk5 en cultivos primarios espinales**

Luego de 14-15 días de maduración, los cultivos primarios espinales fueron infectados para sobreexpresar el activador p35 o tratados con roscovitina para inhibir la señalización de Cdk5. Para evaluar la sobreactivación de Cdk5, cultivos de médula espinal fueron infectados por 3 días con virus adeno-asociados (AVV). Se utilizaron dos AVV, uno promoverá la expresión de p35 y otro se utilizará como condición control el cual expresará sólo GFP (AAV9-hsyn-GFP, AAV9-hsyn-p35/GFP). Para llevar a cabo la infección/inhibición y evitar la muerte o estrés neuronal, se removió 100 µL de medio de cultivo del pocillo a infectar/inhibir y se mezcló con el virus/molécula para luego ser nuevamente agregados en forma de gotas directamente sobre el medio en el pocillo. Como primer tratamiento, para la



infección, los cultivos fueron tratados con 7.5  $\mu$ L de virus para placas de 24 pocillos.

Como segundo tratamiento, de manera aislada al anterior, para evaluar los efectos de la inhibición de Cdk5, los cultivos fueron incubados con roscovitina (30  $\mu$ M) (AK Scientific, California) o DMSO como vehículo. Luego de 72 h de infección/inhibición los cultivos primarios neuronales fueron fijados para inmunodetección.

#### **4. Inmunofluorescencia**

Los ensayos de inmunofluorescencia fueron realizados 24 h posterior a la transfección de células HEK293 con las diferentes conformaciones de RGli recombinantes y luego 14 – 21 días de maduración de cultivos primarios espinales en el caso de RGli nativos.

##### **4.1 Inmunofluorescencia en células HEK293.**

Para estudiar la expresión y localización del RGli, las células transfectadas fueron lavadas 2 veces con PBS 1X por 1 min para luego ser fijadas con paraformaldehído 4% (Sigma-Aldrich, MO) por 15 min a 4°C y luego fueron bloqueadas durante 30 min (BSA 5%, Genesee Scientific). Las células fueron incubadas con el anticuerpo primario a 4°C durante 1 h en cámara húmeda. Para investigar la localización en la membrana celular del RGli, la incubación del anticuerpo primario se realizó en células sin

permeabilizar, de acuerdo con estudios previos del laboratorio (Moraga-Cid et al., 2020). En cambio, para estudiar la expresión total del receptor, el anticuerpo primario fue incubado en condiciones permeabilizantes utilizando Tritón X-100 0,1%. Luego de la incubación con el anticuerpo primario, las células se lavaron 3 veces con PBS 1X por 3 min y se incubaron con el anticuerpo secundario por 30 min en cámara húmeda en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, las células fueron lavadas 3 veces por 3 min con PBS 1X y se montaron en medio de montaje (Fluorescence Mounting Medium, Dako Cytomation Dako, USA) el que se dejó secar toda la noche a temperatura ambiente y en oscuridad.

#### **4.2 Inmunofluorescencia en cultivos primarios de médula espinal**

Para estudiar la expresión de RGli nativo en cultivos primarios de neuronas espinales, se lavó 1 vez PBS 1X por 1 min para luego ser fijadas con paraformaldehído 4% (Sigma-Aldrich, MO) por 20 min a 4°C. Las neuronas fueron permeabilizadas por 10 min utilizando Tritón X-100 0.1%, y luego sobre la solución de permeabilización se agregó solución de bloqueo (BSA 5%, Genesee Scientific) por 30 min. Luego las neuronas fueron incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche a 4°C, para al día siguiente ser lavadas 5 veces con PBS 1X por 3 min. Al finalizar los lavados las neuronas fueron incubadas con anticuerpos secundarios durante 2 horas a temperatura ambiente, para finalmente ser lavadas 5 veces con PBS 1X por 3 min y se realizó un último lavado en agua destilada previo al montaje (Fluorescence Mounting Medium, Dako

Cytomation Dako, USA). Las muestras se dejaron secar toda la noche a temperatura ambiente y en oscuridad.

### **4.3 Anticuerpos utilizados**

El receptor de glicina se marcó mediante un epítotope de histidina utilizando el anticuerpo Mouse 6x-His (1:100 diluido en BSA 5%, Proteintech, USA) y luego como anticuerpo secundario se utilizó Cy3 anti-mouse (1:500 diluido en BSA 5%, Jackson Immuno Research Laboratories, USA) para la condición sin permeabilizar, y para la condición de células permeabilizadas se utilizó un anticuerpo Cy5 anti-mouse (1:500 diluido en BSA 5%/ Jackson Immuno Research Laboratories, USA). Para corroborar la expresión tanto de p35 y GFP en las células, se utilizó un anticuerpo anti-rabbit para p35/25 (1:200 diluido en BSA 5%/ Cell Signaling #2680S) y como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo Cy5 anti-rabbit (1:500 diluido en BSA 5%/ Jackson Immuno Research Laboratories, USA). Para analizar RGli nativo en neuronas se utilizó el anticuerpo Pan- $\alpha$  (1:500 diluido en BSA 5%, Synaptic Systems GmbH, Germany) y como marcador neuronal se utilizó un anticuerpo anti-MAP2 (1:300 diluido en BSA 5%, Synaptic Systems GmbH, Germany)

### **4.4 Análisis de expresión relativa a través de imágenes confocales**

Para los análisis cuantitativos de inmunofluorescencia, los campos de visualización de las células fueron escogidos de manera aleatoria para ser

observados en el Microscopio láser confocal, LSM700 Zeiss (CMA Bio-Bio) donde la configuración de los laser utilizados se mantuvo igual para todas las condiciones analizadas en cada experimento. Se obtuvieron de 4 a 6 imágenes por muestra en forma de “*stacks*” con 0.5  $\mu\text{m}$  de intervalo, las cuales se adquirieron en 2 canales de inmunofluorescencia de color verde (488nm) y rojo (550nm). El lente objetivo utilizado fue de 40X. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia asociados a los receptores se realizó de manera *off-line* utilizando el software ImageJ (NIH, USA) en donde se procesaron las imágenes como proyecciones de máxima intensidad (MIPs). A partir de las MIPs se analizó la fluorescencia de célula completa, a la cual se le restó el fondo ( $\Delta(F-F^{\circ})$ ), obteniendo sólo la fluorescencia asociada a la expresión total del receptor. Para esta medición se demarcó de manera manual el borde celular en las MIPs de cada célula y se analizó en el canal rojo para RGLi. En estos análisis se consideraron sólo las células que presentaban ambos canales (verde y magenta) en ambas condiciones. De esta forma, se cuantificó la intensidad de fluorescencia de RGLi únicamente en las células que sobre expresan p35.

## **5. Análisis estadísticos**

Los datos obtenidos a partir de la cuantificación de intensidad de inmunofluorescencia fueron analizados utilizando el programa Prism (GraphPad) versión 6.01. Para la comparación de los datos obtenidos en las 2 condiciones de trabajo (control y transfectadas con p35) se realizó la prueba *t-Student* en condición no pareada para comparar las variaciones en la

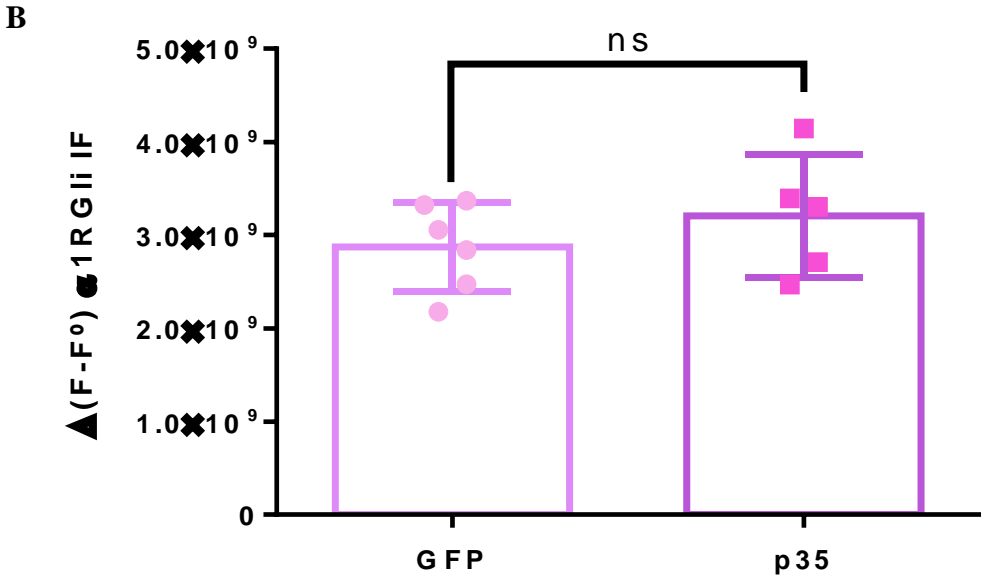
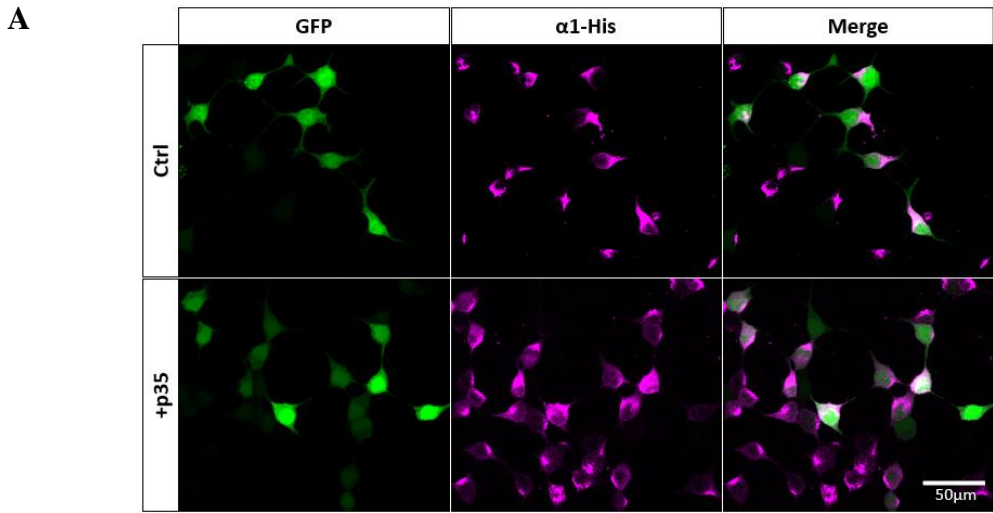
fluorescencia de ambos grupos. En el caso de tratamiento con roscovitina se utilizó la prueba ANOVA unidireccional con post hoc de múltiple comparación Bonferroni (Se compararon todos los grupos contra todos, o contra la condición de activación/inhibición de Cdk5). Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ . Los datos son presentados en los gráficos como valor de la media  $\pm$  SEM.

## RESULTADOS

### 1.- Efectos de la activación Cdk5 en la expresión de RGli compuestos de subunidades $\alpha 1$

Se analizaron los efectos de la activación de Cdk5 sobre la expresión en membrana de  $\alpha 1$ -RGli. Para ello, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica sin permeabilizar en células HEK293 co-transfectadas en las siguientes condiciones: i)  $\alpha 1$ -RGli ( $\alpha 1$ -His) + GFP (condición control), ii)  $\alpha 1$ -RGli ( $\alpha 1$ -His) y p35/GFP (condición de activación de Cdk5). Las imágenes obtenidas muestran en magenta el marcaje de  $\alpha 1$ -RGli asociado a membranas celulares y en canal verde se observa el marcaje citoplasmático de GFP (**Figura 7A**). De forma cualitativa se observa en las imágenes que la señal de  $\alpha 1$ -RGli es más abundante que la señal de EGFP (**Figura 7A**). En nuestro análisis cuantitativo la señal de fluorescencia asociada al RGli fue estudiada mediante microscopía confocal sólo en células que mostraron tanto la señal verde para GFP y magenta para RGli (**Figura 7A**). Esta estrategia permite analizar la expresión en membrana de  $\alpha 1$ -RGli exclusivamente en células que expresan p35, las cuales, por ende, tienen activada a Cdk5. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia en condiciones control no fue significativamente diferente a la condición de sobreexpresión de p35 (GFP= $2,872 \times 10^9 \pm 1,937 \times 10^8$  v/s p35= $3,204 \times 10^9 \pm 2,926 \times 10^8$ ; t-Student no pareado, valor de  $p=0,3546$ ) (**Figura 7B**). Por lo tanto, los resultados

sugieren que la activación de Cdk5 no afecta la expresión en la membrana celular de RGlI en su conformación  $\alpha 1$  homopentamérica.



**Figura 7. La activación de Cdk5 no produce alteraciones significativas en la expresión de  $\alpha 1$ -RGli.**

(A) Imagen obtenidas mediante microscopía confocal representativa de inmunocitoquímica para  $\alpha 1$ -RGli (40X). Las imágenes fueron obtenidas mediante z-stack y procesadas como Proyección de Máxima Intensidad (MIP). Barra de calibración: (A) 50  $\mu$ m. (B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de  $\alpha 1$ -RGli ( $\alpha 1$ -His) en ambas condiciones. Los datos cuantificados se obtuvieron a partir de análisis de las imágenes utilizando el programa ImageJ. Los resultados presentan la media  $\pm$  SEM de 3 réplicas para cada condición (N=3) en donde se analizaron 2 covers (pocillos) por cada experimento (n=6), (GFP= 185 células; p35= 208 células). t-Student no pareado, ns, no significativo.

**2.- Efectos de la activación Cdk5 en la expresión de RGli compuestos de subunidades  $\alpha 1$  y  $\beta$ .**

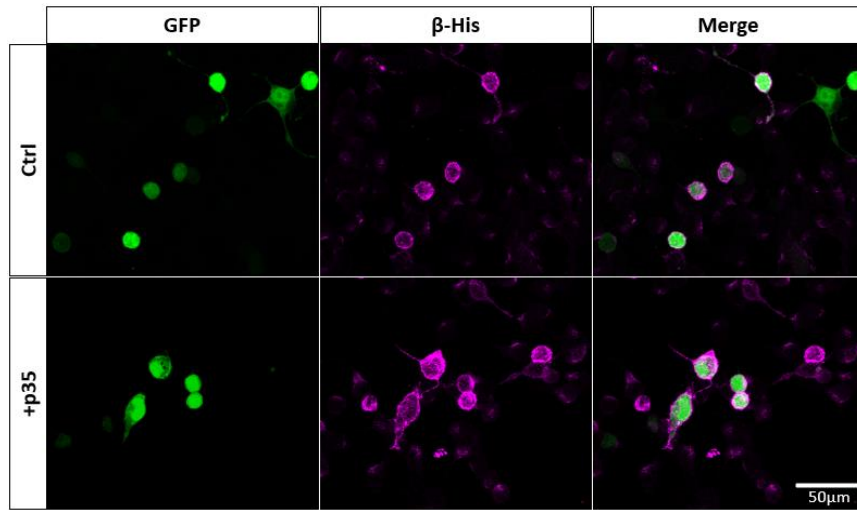
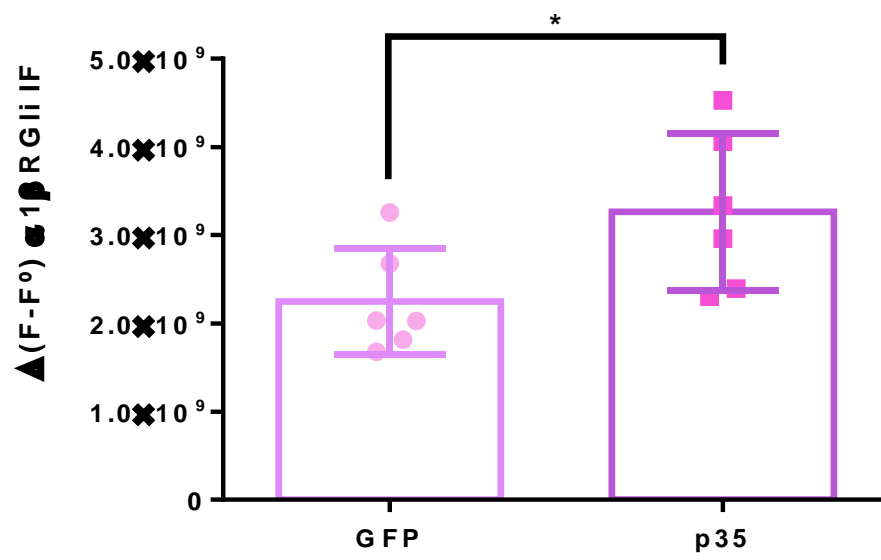
De manera similar al punto anterior, se utilizaron sistemas recombinantes para estudiar los cambios en la expresión de  $\alpha 1\beta$ -RGli debido a la activación de Cdk5. En esta serie de experimentos se utilizó un plásmido que codifica a la subunidad  $\alpha 1$ -RGli silvestre en combinación con un plásmido que codifica la subunidad  $\beta$  con epítopes extracelulares de V5 y His. De este modo, pudimos determinar directamente la expresión de  $\beta$  en posible combinación con subunidades  $\alpha 1$ .

Mediante el análisis de las imágenes obtenidas a partir de microscopia confocal (**Figura 8A**), se evaluó si la activación de Cdk5 debido a la



sobreexpresión de p35 produce algún cambio en la intensidad de fluorescencia de RGli heteropentaméricos en células sin permeabilizar. De manera cualitativa se observa en magenta la señal de  $\beta$ -RGli con un patrón punteado y asociado a membrana, mientras que la señal de GFP se observa uniformemente distribuida en el citoplasma (**Figura 8A**). Este patrón es más evidente al observar la colocación de los dos canales de estudio. Sólo se analizaron células que presentan tanto la señal para el canal verde (p35) como el magenta ( $\beta$ -RGli). Los resultados obtenidos a partir de la cuantificación de la intensidad de fluorescencia sugieren un aumento significativo en la expresión del receptor  $\alpha 1\beta$ -RGli en presencia de p35 en comparación a la condición control (control= $2,24 \times 10^9 \pm 2,455 \times 10^8$  v/s p35= $3,263 \times 10^9 \pm 3,655 \times 10^8$ ; \*p <0.05, t-Student no pareado, valor de p=0,0437) (**Figura 8B**). Así, a diferencia de  $\alpha 1$ -RGli, aproximaciones inmunocitoquímicas sugieren que  $\alpha 1\beta$ - $\mu\mu$  aumenta su expresión en la membrana al activar Cdk5 mediante la sobreexpresión de p35.

Además, a partir de inspección cualitativa de las imágenes es posible observar un cambio en el perfil de expresión de membrana entre receptor homomérico y heteropentámerico. Así, mientras la expresión de  $\alpha 1$  muestra un marcaje más difuso centrado levemente hacia la membrana plasmática, mientras que la co-expresión de  $\alpha 1$  y  $\beta$  muestra una distribución fuertemente descentralizada en toda la superficie celular, así como también un patrón mayormente punteado del receptor (**Figura 8A**).

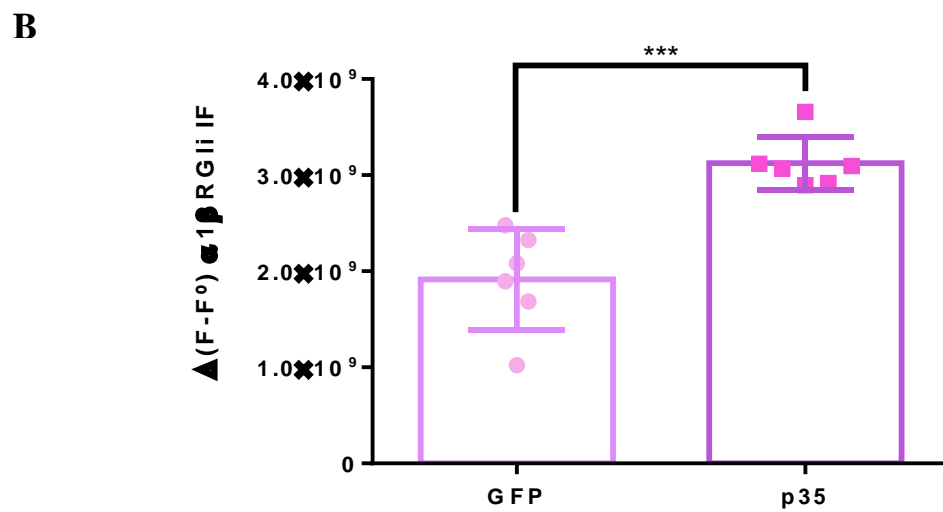
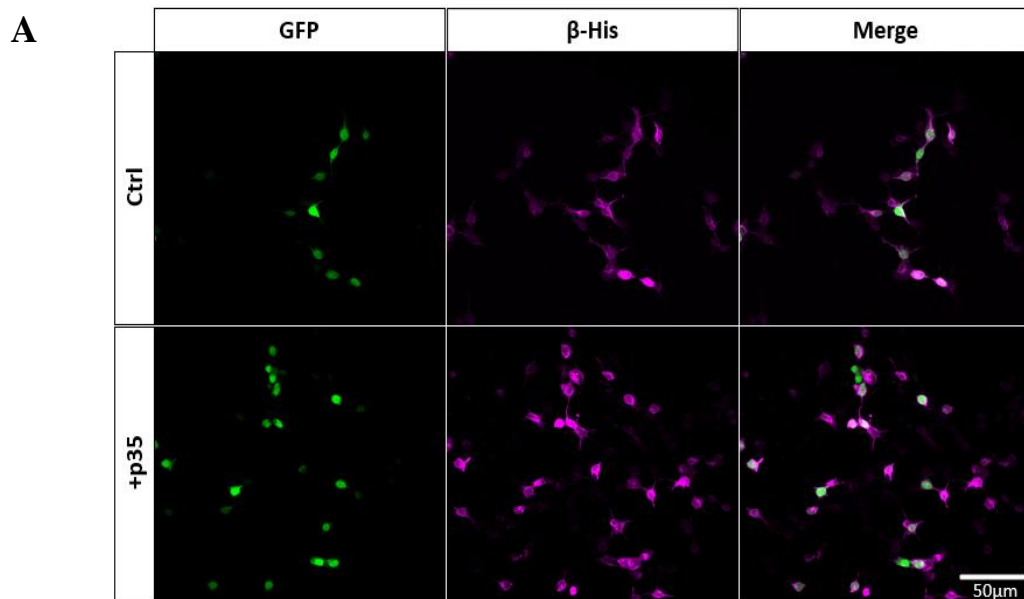
**A****B**

**Figura 8. La activación de Cdk5 resulta en un aumento en la fluorescencia asociada a RGlI heteropentámerico en la superficie celular.**

Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal muestran en color verde el control de transfección GFP, en magenta al  $\beta$ -RGlI ( $\beta$ -His) y la superposición de ambos canales (blanco). **(A)** Imagen representativa de inmunocitoquímica para  $\beta$ -RGlI (40X). Barra de calibración: (A) 50  $\mu$ m. **(B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de  $\beta$ -RGlI ( $\beta$ -His) en ambas condiciones. Los datos cuantificados se obtuvieron a partir de análisis de las imágenes utilizando el programa ImageJ. Los resultados presentan la media  $\pm$  SEM de 3 réplicas para cada condición (N=3) en donde se analizaron 2 covers (pocillos) por cada experimento (n=6), (GFP= 311 células; p35= 316 células). t-Student no pareado, \*p <0.05.

En una segunda aproximación experimental, se evaluó si la activación de Cdk5 mediante sobreexpresión de p35 tiene algún efecto en la expresión total del RGlI heteropentámerico. Para ello, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica en células permeabilizadas, lo que permitió evaluar la expresión integrada de receptores en membrana y en compartimentos intracelulares. Cualitativamente se observa que cada canal por separado presenta un patrón de marcaje uniforme. Sin embargo, la superposición de ambos muestra que la señal de GFP es más bien citoplasmática mientras que la señal de  $\beta$ -RGlI se encuentra asociado a la membrana citoplasmática (**Figura 9A**). La cuantificación de la intensidad de fluorescencia indica un aumento significativo en la expresión total de RGlI en la condición de transfección con p35 al compararlo con la condición control (GFP=1,915x10<sup>9</sup>

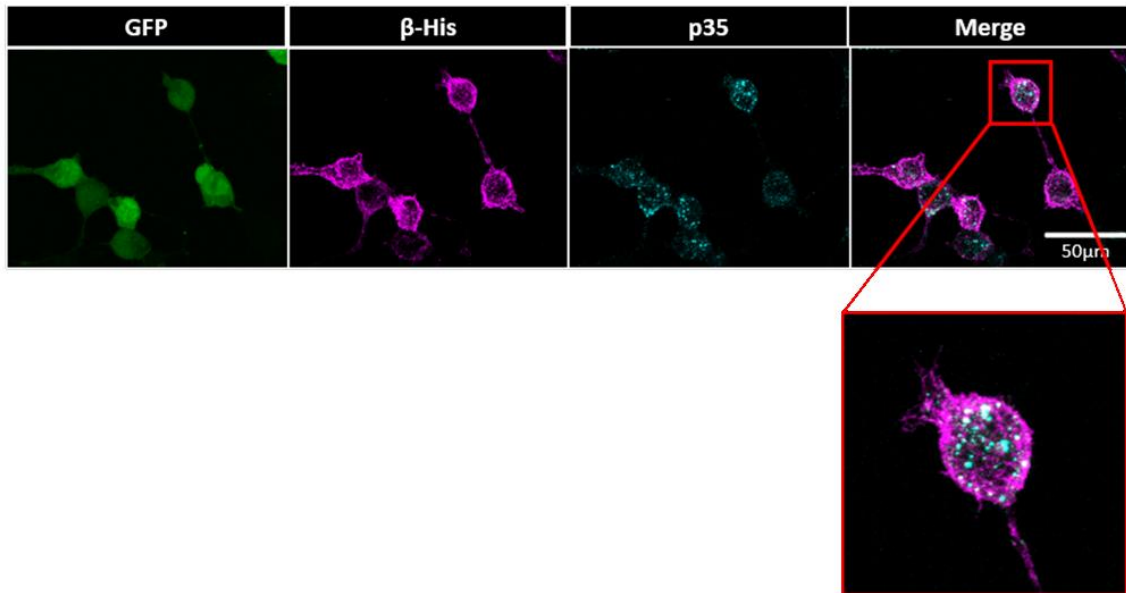
$\pm 2,131 \times 10^8$  v/s p35 =  $3,126 \times 10^9 \pm 1,130 \times 10^8$ ; \*\*\*p < 0.001, t-Student no pareado, valor de p = 0,0005) (Figura 9B).



**Figura 9. La activación de Cdk5 resulta en un aumento en la fluorescencia asociada a RGlI heteropentámericos en células permeabilizadas.**

Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal muestran en color verde el control de transfección GFP, en magenta al  $\beta$ -RGlI ( $\beta$ -His) y la superposición de ambos canales (blanco). **(A)** Imagen representativa de inmunocitoquímica para  $\beta$ -RGlI (40X). Barra de calibración: (A) 50  $\mu$ m. **(B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia total de  $\beta$ -RGlI ( $\beta$ -His) en ambas condiciones. Los datos cuantificados se obtuvieron a partir de análisis de las imágenes utilizando el programa ImageJ. Los resultados presentan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos para cada condición (N=3) en donde se analizaron 2 covers (pocillos) por cada experimento (n=6), (GFP= 313 células; p35= 347 células). t-Student no pareado, \*\*\*p <0.001.

Para confirmar que la transfección produce efectivamente una sobreexpresión de p35, se realizó una inmunocitoquímica en células HEK293 utilizando un anticuerpo que reconoce p35 junto a los anticuerpos anteriormente utilizados. Como se observa en el panel de la **Figura 10**, GFP en color verde aparece con el característico marcaje citoplasmático y  $\beta$ -RGlI ( $\beta$ -His) presenta un marcaje punteado principalmente en la membrana citoplasmática (**Figura 10**). El canal celeste indica el marcaje del anticuerpo anti p35, el cual se observa en forma de clústers citoplasmáticos (**Figura 10**). Además, al superponer los canales se observa un grado de colocación entre la señal de  $\beta$ -RGlI y la asociada a p35.

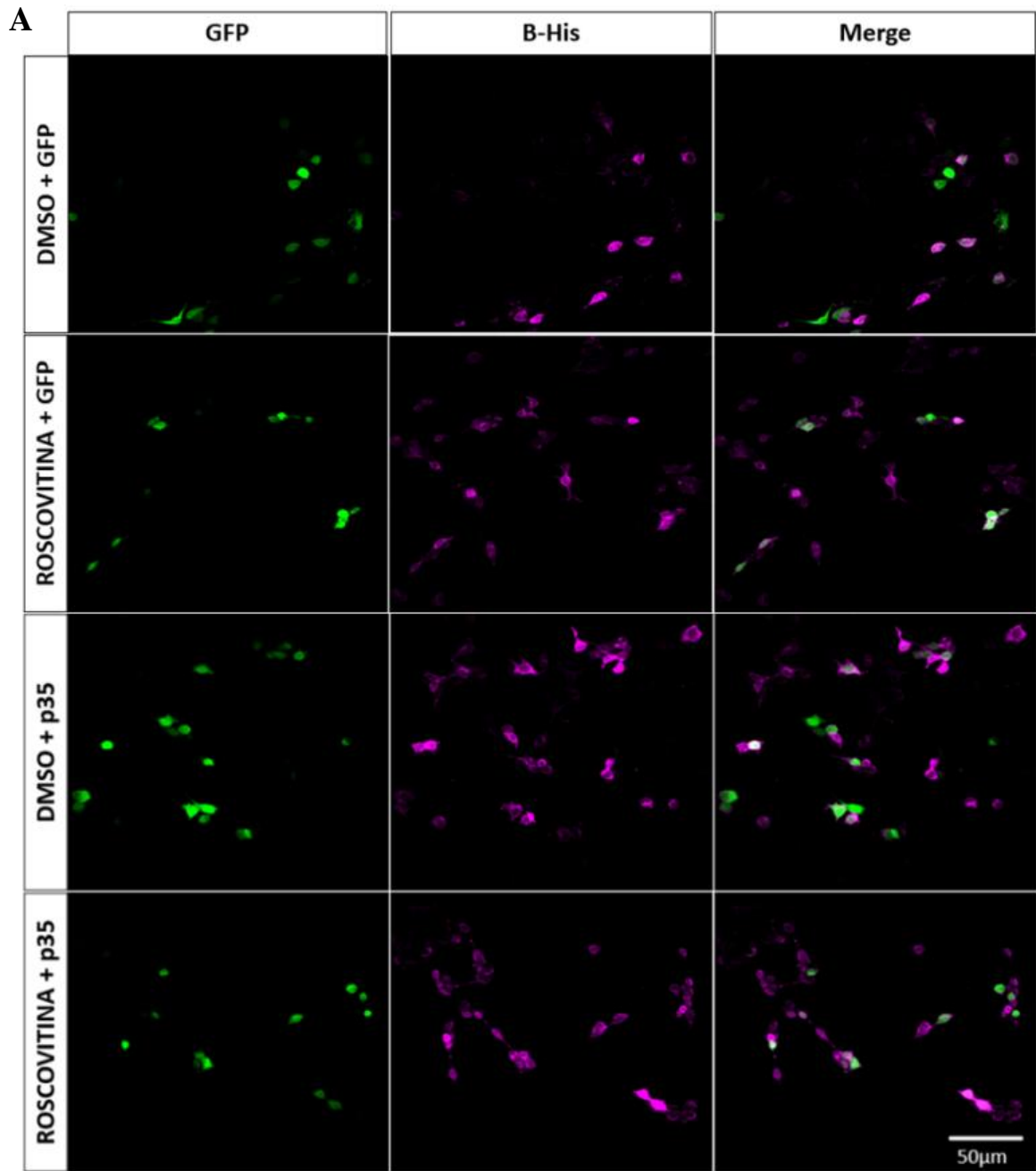


**Figura 10. Expresión de p35 en células HEK293 co-transfectadas.**

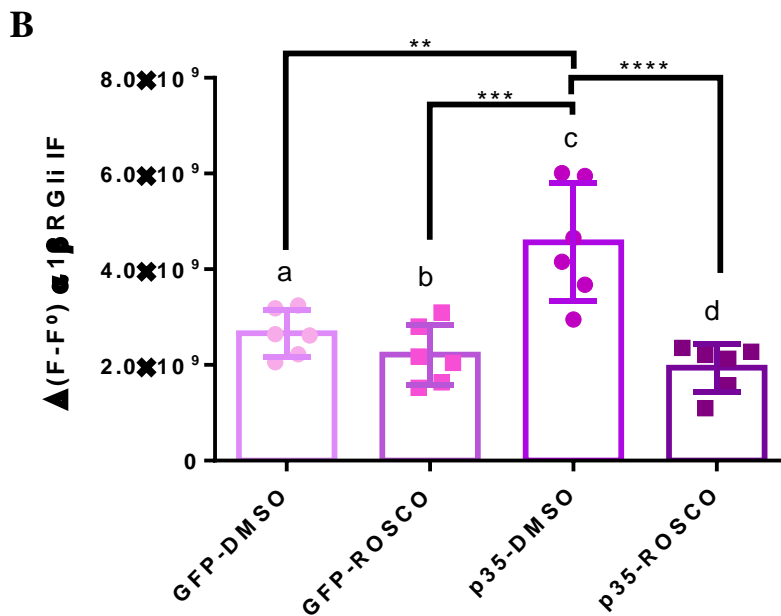
Células HEK293 co-transfectadas con  $\alpha 1$ -WT y  $\beta$ -His-RGli en conjunto con GFP/p35, analizadas mediante inmunocitoquímica. Imágenes adquiridas mediante microscopía confocal 40X y presentadas como MIPs. En color verde GFP, en color magenta se observa a  $\beta$ -RGli y en color cian a p35. Merge entre RGli y p35 (blanco). Barra de calibración: 50 $\mu$ m.

En una aproximación alternativa para corroborar la influencia de Cdk5 en la expresión de  $\alpha 1\beta$ -RGli, se estudió el efecto de la inhibición de esta quinasa utilizando el inhibidor roscovitina. Células HEK293 transfectadas con  $\alpha 1\beta$ -RGli y GFP o p35-GFP fueron incubadas con 30  $\mu$ M roscovitina por 12h (GFP-ROSCO) o DMSO (GFP-ROSCO) como vehículo (**Figura 11A**). En el grupo control, el cual fue transfectado con  $\alpha 1\beta$ -RGli y GFP, muestra el patrón de marcaje que se ha observado en los experimentos anteriores

(Figura 8A y 9A). La cuantificación de la intensidad de fluorescencia de GFP-ROSCO indica que el tratamiento con roscovitina no produce diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia de  $\alpha 1\beta$ -RGlI al compararla con el grupo GFP-DMSO (Figura 11A). En el caso del grupo p35-DMSO, al ser comparado con los grupos control, la cuantificación de la intensidad de fluorescencia mostró que la sobreexpresión de p35 produce un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia de  $\alpha 1\beta$ -RGlI (GFP-DMSO=2,661x10<sup>9</sup> vs p35-DMSO=4,566x10<sup>9</sup>; GFP-ROSCO=2,214x10<sup>9</sup> vs p35-DMSO=4,566x10<sup>9</sup>; p35-ROSCO=1,943x10<sup>9</sup> vs p35-DMSO=4,566x10<sup>9</sup>; \*\*\*\*p <0.0001, ANOVA con post hoc de Bonferroni, comparación múltiple de todos los grupos contra todos, valor de p=0,0023, p=0,0002 y p=< 0,0001 respectivamente) (Figura 11B). La cuantificación del grupo p35-ROSCO indicó que el bloqueo de la actividad de Cdk5 produce una disminución significativa de la intensidad de fluorescencia de  $\alpha 1\beta$ -RGlI comparado con el grupo p35-DMSO (p35-ROSCO=1,943x10<sup>9</sup> vs p35-DMSO=4,566x10<sup>9</sup>; p < 0,0001) (Figura 11B), alcanzando valores de intensidad de fluorescencia similares al grupo control. De este modo, los resultados obtenidos confirman que la actividad de Cdk5 modifica la expresión en membrana de heteropentámeros  $\alpha 1\beta$ -RGlI.







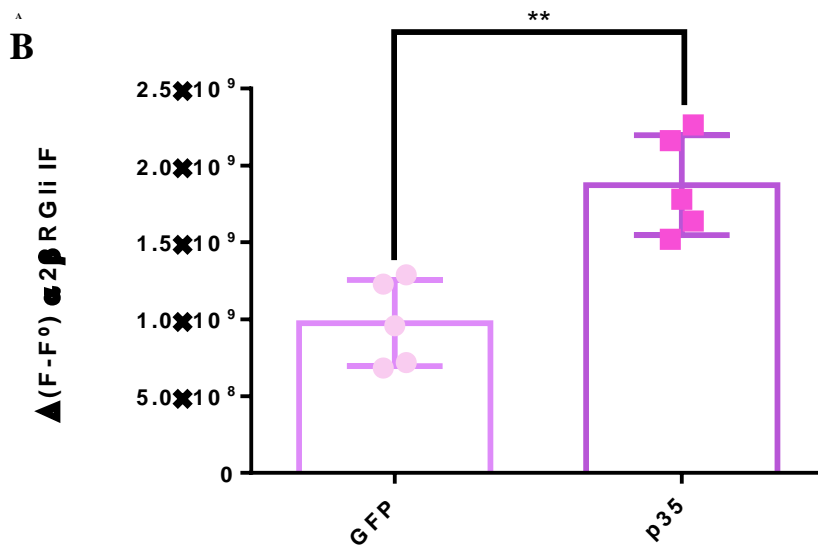
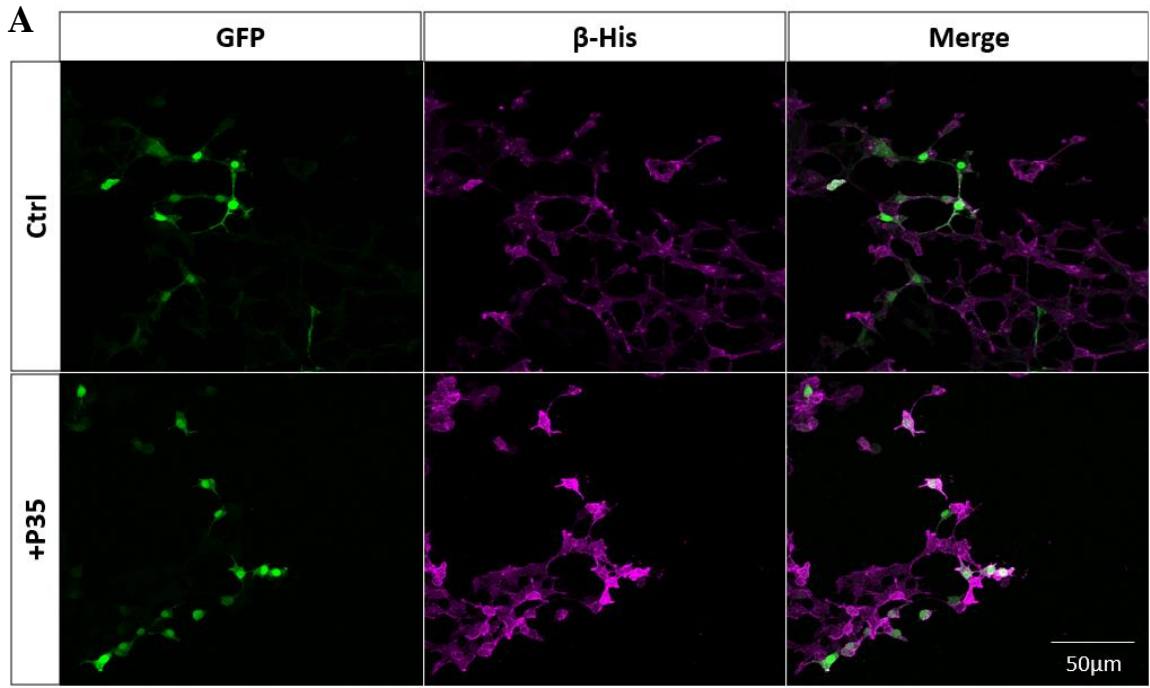
**Figura 11. Roscovitina bloquea el aumento en la expresión de  $\alpha1\beta$ -RGli producido al activar Cdk5.**

Las imágenes obtenidas mediante microcopia confocal muestran en color verde el control de transfección GFP, en magenta a  $\beta$ -RGli ( $\beta$ -His) y la superposición de ambos canales (blanco), esto tanto para el caso control (GFP) en condiciones de vehículo (DMSO) e inhibición (rosco), así como también de activación de Cdk5 (+p35) en ambas condiciones (rosco y DMSO). (A) Imagen representativa de inmunocitoquímica para  $\beta$ -RGli (40X). Barra de calibración: 50  $\mu$ m. (B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia total de RGli en las 4 condiciones de trabajo. Los datos cuantificados se obtuvieron a partir de análisis de las imágenes obtenidas utilizando el programa ImageJ. Los resultados presentan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos para cada condición (N=3) en donde se analizaron 2 pocillos

por cada experimento (n=6), (GFP-DMSO= 419 células; GFP-ROSCO= 469 células; p35-DMSO= 383 células; p35-ROSCO= 449 células). ANOVA unidireccional con post hoc de Bonferroni, comparación múltiple de todos los grupos contra todos, \*\*p <0.01, \*\*\*p <0.001\*\*\*\*p <0.0001.

### **3.- Efectos de la activación Cdk5 en la expresión de RGli compuestos de subunidades $\alpha 2/3$ y $\beta$ .**

En la siguiente sección de experimentos se exploraron los efectos de la activación de Cdk5 sobre RGli heteroméricos compuestos por las subunidades  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ . Para ello, se realizaron transfecciones transientes para expresar  $\alpha 2\beta$ -RGli o  $\alpha 3\beta$ -RGli en conjunto con GFP o GFP-p35, y posteriormente se realizaron ensayos de inmunocitoquímica para evaluar los cambios en la expresión total de  $\beta$ -RGli ( $\beta$ -His) producidos por la activación de Cdk5 (**Figura 12 y 13**). Al analizar las células que presentaron señal tanto para el canal verde (GFP) como el rojo ( $\beta$ -RGli) se determinó que la sobreexpresión de p35 mostró un aumento significativo en la expresión total de  $\alpha 2\beta$ -RGli en la condición de transfección con p35 al compararlo con la condición control (control= $9,746 \times 10^8 \pm 1,254 \times 10^8$  v/s p35= $1,872 \times 10^9 \pm 1,456 \times 10^8$ ; \*\*p <0.01, t-Student no pareado, valor de p=0,0016) (**Figura 12B**).

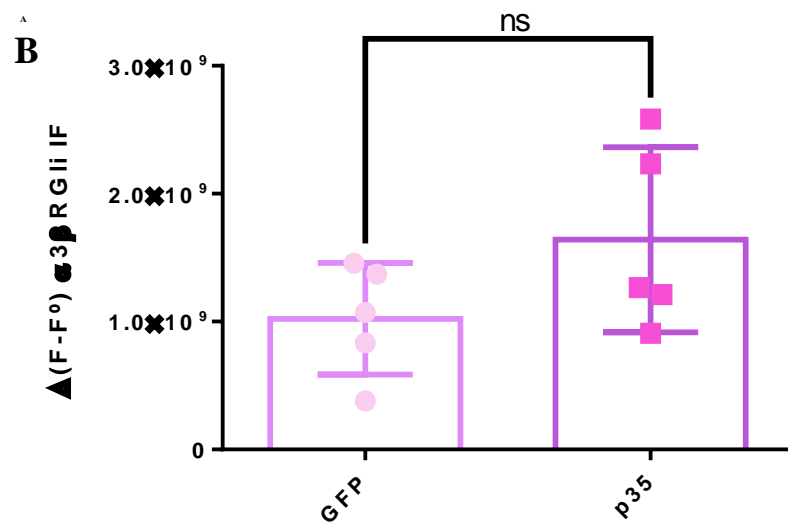
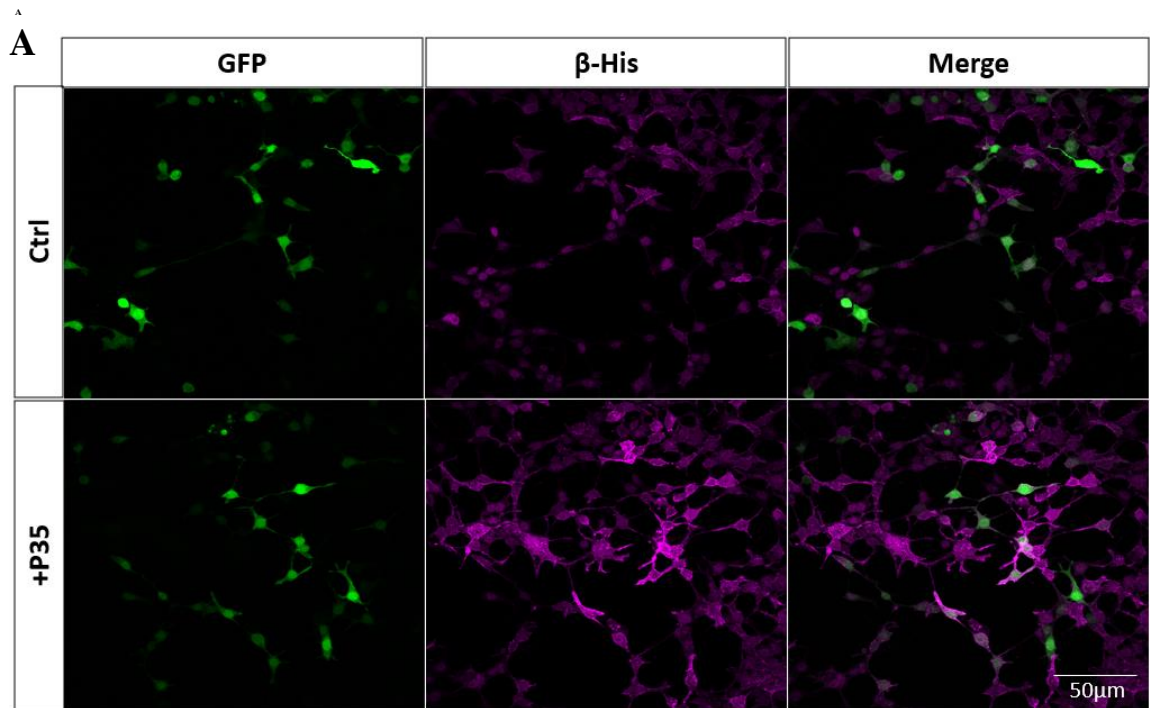


**Figura 12. La activación de Cdk5 resulta en un aumento en la expresión total de  $\alpha 2\beta$ -RGlI heteropentámicos.**

Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal muestran en color verde el control de transfección GFP, en magenta al  $\beta$ -RGlI ( $\beta$ -His) y la superposición de ambos canales (blanco). **(A,)** Imagen representativa de inmunocitoquímica para  $\beta$ -RGlI (40X). Barra de calibración: (A) 50 $\mu$ m. **(B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia total de  $\beta$ -RGlI ( $\beta$ -His) en ambas condiciones. Los datos cuantificados se obtuvieron a partir de análisis de las imágenes utilizando el programa ImageJ. Los resultados presentan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos para cada condición (N=3) en donde se analizaron 1-2 covers (pocillos) por cada experimento (n=5), (control= 152 células; p35= 175 células). t-Student no pareado, \*\*p <0.01.

Al analizar los experimentos realizados en la conformación  $\alpha 3\beta$ -RGlI, los datos mostraron solo una tendencia al aumento en la fluorescencia en los experimentos, ya que no se obtuvieron diferencias significativas al comparar la condición control con la condición de activación de Cdk5 con p35. (GFP=1,022 x10<sup>9</sup>  $\pm$  1,953 x10<sup>8</sup> v/s p35=1,641 x10<sup>9</sup>  $\pm$  3,239 x10<sup>8</sup>, t-Student no pareado, valor de p=0,1407) **(Figura 13B).**

Por lo tanto, los datos presentados en esta sección si bien nos dicen que p35 puede modular la expresión de manera significativa de  $\alpha 2\beta$ -RGlI, para el caso de la conformación  $\alpha 3\beta$ -RGlI esta variación no fue significativa.



**Figura 13. La activación de Cdk5 no modula la expresión de  $\alpha3\beta$ -RGlI heteropentámericos.**

Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal muestran en color verde el control de transfección GFP, en magenta al  $\beta$ -RGlI ( $\beta$ -His) y la superposición de ambos canales (blanco). **(A,)** Imagen representativa de inmunocitoquímica para  $\beta$ -RGlI (40X). Barra de calibración: (A) 50 $\mu$ m. **(B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia total de  $\beta$ -RGlI ( $\beta$ -His) en ambas condiciones. Los datos cuantificados se obtuvieron a partir de análisis de las imágenes utilizando el programa ImageJ. Los resultados presentan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos para cada condición (N=3) en donde se analizaron 1-2 covers (pocillos) por cada experimento (n=5), (GFP= 211 células; p35= 171 células). t-Student no pareado; ns, no significativo.

**4.- Efectos de la activación e inhibición de Cdk5 sobre la expresión de RGlI nativos en cultivos primarios de neuronas espinales**

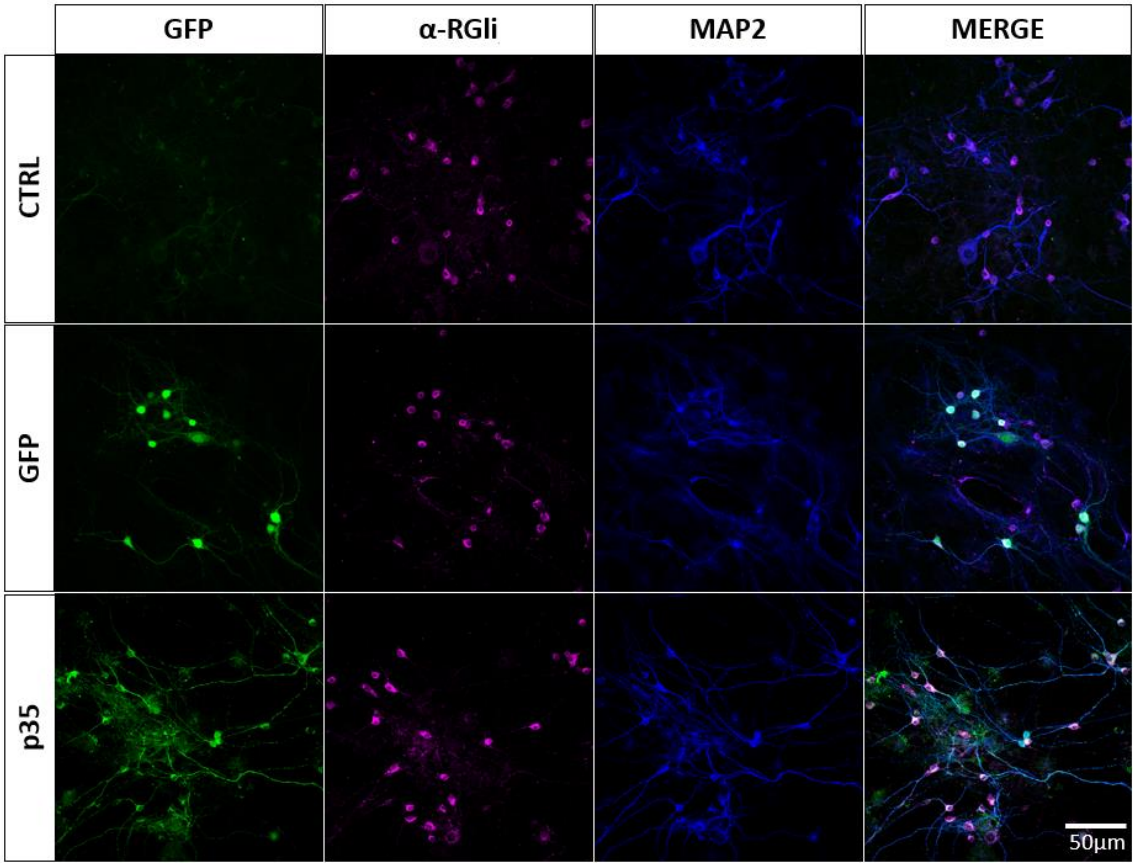
Previamente determinamos que  $\alpha1\beta$ -RGlI expresados en células HEK293 puede ser modulado por Cdk5 al promover su activación mediante una sobreexpresión de su activador p35. Dado que la activación de Cdk5 puede modular la localización subcelular de RGlI en células HEK293, hipotetizamos que, en un contexto neuronal, al activar Cdk5 podría verse alterada la expresión de RGlI. De manera inicial, para determinar si la actividad de Cdk5 afecta la expresión o localización subcelular de RGlI

nativos, se trabajó con cultivos primarios de neuronas espinales las cuales fueron sometidas diferentes condiciones.

Para evaluar las consecuencias de la activación de Cdk5, cultivos de médula espinal fueron infectados con adenovirus asociado que expresan p35/GFP (AVV-p35/GFP) y como control de esta condición se trabajó con un adenovirus asociado el cual expreso GFP (AAV-GFP). Además, se hicieron estudios con cultivos neuronales control sin infección (**Figura 14**). Luego de 3 días de infección, y en condiciones de permeabilización, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica en donde los RGli fueron marcados mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce las subunidades  $\alpha$  de RGli. El efecto de la activación de Cdk5 en los RGli nativo, se analizó a partir de las imágenes obtenidas por microscopia confocal (**Figura 14A**). Al igual que cuando se analizaron las imágenes obtenidas desde cultivos de HEK293, se analizaron sólo las neuronas (MAP2+) que poseían tanto los canales verdes (GFP) como magenta ( $\alpha$ -RGli). Los resultados obtenidos a partir de la cuantificación indican que comparado con las neuronas control con GFP y las no infectadas, el grupo que sobreexpresó p35 presentó una disminución significativa de la intensidad de fluorescencia del canal correspondiente a los RGli (p35=7,034x10<sup>8</sup> vs CTRL=1,027x10<sup>9</sup>; p35=7,034x10<sup>8</sup> vs GFP=1,101x10<sup>9</sup>; \*p <0.05, \*\*p <0.01, ANOVA con post hoc de Bonferroni, comparación múltiple de las condiciones CTRL y GFP vs p35, valor de p= 0,0307 y p= 0,0092 respectivamente; control= 137 células; GFP= 135; p35= 123 células) (**Figura 14B**). Así, de manera contraria a lo observado en células HEK293 co-transfectadas con  $\alpha$ 1 $\beta$ -RGli, y  $\alpha$ 2 $\beta$ -RGli, estos resultados

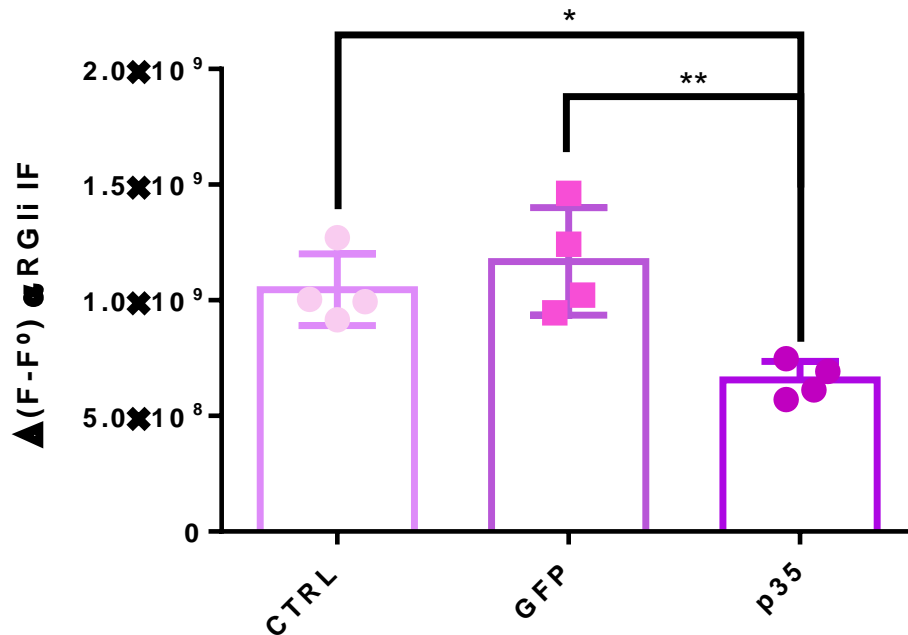
sugieren que la activación de Cdk5 disminuye la expresión de los RGli nativos de neuronas espinales.

<sup>A</sup>  
A





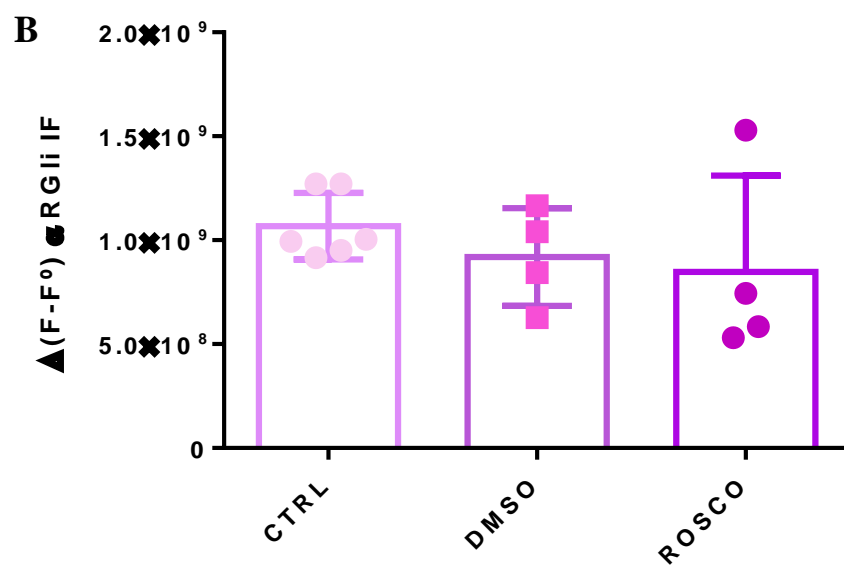
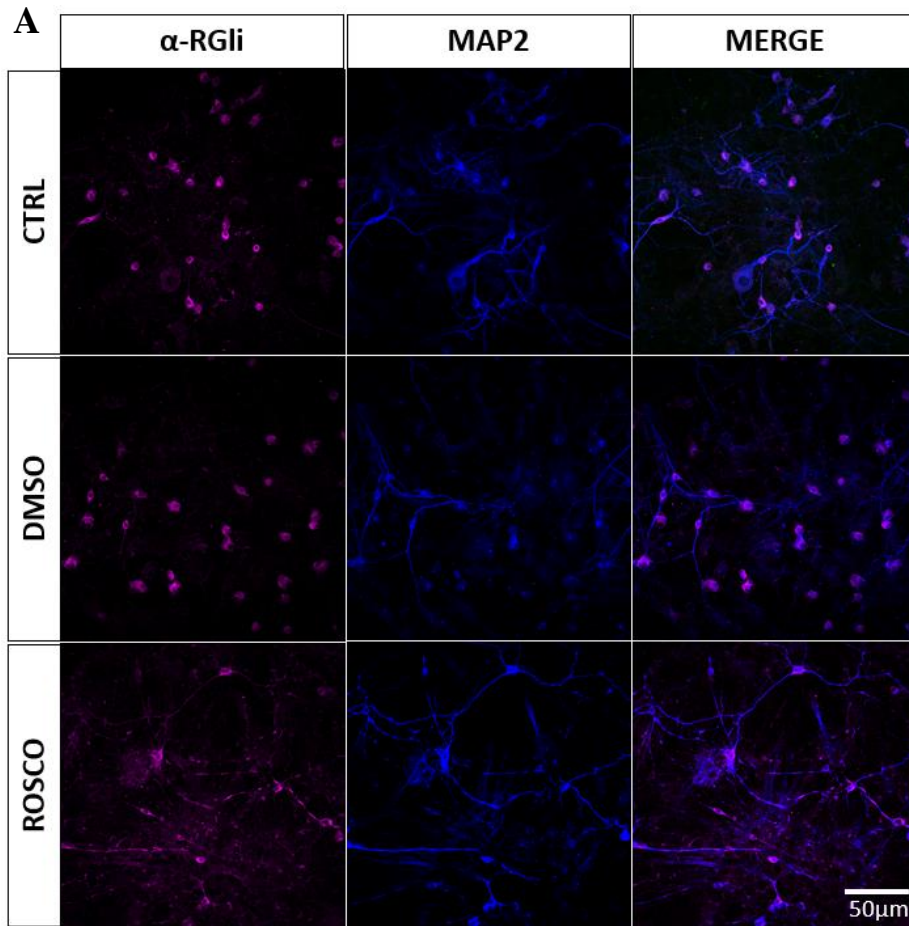
**B**



**Figura 14. La activación de Cdk5 resulta en una disminución de la expresión de RGli en cultivos primarios de neuronas espinales.**

Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal muestran en color verde el control de la infección GFP, en magenta al  $\alpha$ -RGli, en azul MAP2 (proteína asociada a microtúbulo 2) y la superposición de los 3 canales (MERGE). (A) Imagen representativa de inmunocitoquímica para  $\alpha$ -RGli (40X). Barra de calibración: 50 $\mu$ m. (B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia total de  $\alpha$ -RGli en las 3 condiciones. Los datos cuantificados se obtuvieron a partir de análisis de las imágenes utilizando el programa ImageJ. Los resultados presentan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos para cada condición (N=3) en donde se analizaron 1 o 2 covers (pocillos) por cada experimento (n=5), (control= 137 células; GFP= 135; P35= 123 células). (ANOVA con post hoc de Bonferroni, comparación múltiple de las condiciones CTRL y GFP vs P35, \*p <0.05, \*\*p <0.01)

Finalmente, se evaluó los efectos de la inhibición de Cdk5 sobre la localización de RGli nativos. Cultivos primarios de neuronas espinales fueron tratados con roscovitina, DMSO (vehículo) o sin tratamiento durante 3 días de incubación. Luego del tratamiento se realizaron ensayos de inmunocitoquímica en las mismas condiciones del experimento anterior. El efecto de la inhibición de Cdk5 en la fluorescencia asociada a RGli nativo, se analizó a partir de las imágenes obtenidas por microscopia confocal (**Figura 15A**). Para este caso se analizaron las células que poseían señal tanto en los canales azul (MAP2) como magenta ( $\alpha$ -RGli). Los resultados obtenidos a partir de la cuantificación no indican diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (ROSCO= $8,472 \times 10^8$  vs CTRL= $1,068 \times 10^9$ ; ROSCO= $8,472 \times 10^8$  vs DMSO= $9,196 \times 10^8$ ; ANOVA con post hoc de Bonferroni, comparación múltiple de las condiciones CTRL y DMSO vs ROSCO, diferencias no significativas para ambos casos) (**Figura 15B**). Así, a diferencia de lo ocurrido en la condición de sobreactivación de Cdk5, la inhibición de esta quinasa no produjo variaciones significativas en la expresión de RGli.



**Figura 15. La inhibición de Cdk5 no afecta la expresión de RGli en cultivos primarios de neuronas espinales.**

Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal muestran en color magenta al  $\alpha$ -RGli, en azul MAP2 (proteína asociada a microtúbulo 2) y la superposición de los 2 canales (MERGE). **(A)** Imagen representativa de inmunocitoquímica para  $\alpha$ -RGli (40X). Barra de calibración: 50 $\mu$ m. **(B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia total de  $\alpha$ -RGli en las 3 condiciones. Los datos cuantificados se obtuvieron a partir de análisis de las imágenes utilizando el programa ImageJ. Los resultados presentan la media  $\pm$  SEM de SEM de 2 o 3 experimentos para cada condición (N=3) en donde se analizaron 1 o 2 covers (pocillos) por cada experimento (n=6-4), (control= 137 células; DMSO= 89; ROSCO= 72 células). (ANOVA unidireccional con post hoc de Bonferroni, comparación múltiple de las condiciones CTRL y DMSO vs ROSCO. Las diferencias no fueron significativas)

## DISCUSIÓN

El RGli está altamente expresado en la médula espinal y tronco encefálico, y junto con los receptores GABA<sub>A</sub>, son responsables de la transmisión inhibitoria en el SNC (Dutertre et al., 2012). El RGli pertenece a la familia de canales iónicos activados por ligando pentaméricos (pLGICs) los cuales poseen una estructura similar (Nys et al., 2013). Al tener un gran DIC, los miembros de esta familia pueden ver modulada su actividad y expresión a partir de modificaciones en su dominio intracelular (Guo & Wecker., 2002; Terunuma et al., 2008; Pollock et al., 2009; Saliba et al., 2012).

Por otra parte, Cdk5 es una quinasa activa mayormente en neuronas postmitóticas, en donde a partir de diferentes vías de señalización puede ver aumentada su actividad fosforilando diferentes sustratos. De modo interesante, estudios previos han mostrado que procesos de fosforilación modulan la dinámica de los receptores sinápticos, ya sea fosforilando directamente el dominio intracelular del canal o fosforilando proteínas asociadas a estos. Entre los canales fosforilados por Cdk5 esta TRPV1 (Pareek et al., 2007; Rozas et al., 2016), P2X2R (Coddou et al., 2017), los receptores de NMDA (Kwok-on & Nancy, 2009) y de AMPA (Cheng et al., 2022). A la fecha, no existen reportes que asocien a RGli o algún otro receptor inhibitorio pentamérico con la actividad de Cdk5. A partir de esta primicia nos propusimos estudiar si la actividad de esta quinasa podría promover cambios en la expresión o localización subcelular de RGli, sucesos que si ocurre en alguno de los canales mencionados anteriormente (Lui et

al.,2015; Cheng et al., 2022). Mediante técnicas de inmunodetección se propuso analizar si la activación e inhibición de Cdk5 produciría alguna variación en la fluorescencia asociada a RGlis recombinantes y nativos.

### **Modulación de RGli de conformaciones $\alpha 1$ , $\alpha 1\beta$ , $\alpha 2\beta$ , y $\alpha 3\beta$ por la activación de Cdk5 en células HEK293**

Como se mencionó anteriormente, Cdk5 puede modular la expresión y función de diferentes receptores excitatorios tales como TRPV1,  $Ca_v3.2$ , AMPA, P2X2R (Kwok-on & Nancy, 2009; Pareek et al. 2007; Coddou et al., 2017; Gomez et al., 2020; Cheng et al., 2022). Los efectos de una fosforilación mediada por Cdk5 asociada a canales iónicos son variados e incluyen un aumento o disminución en la expresión de estos receptores en la membrana, así como cambios funcionales en la apertura, desensibilización y las corrientes evocadas por el canal (Coddou et al., 2017; Gomez et al., 2020; Cheng et al., 2022). Sin embargo, receptores inhibitorios modulados por la actividad directa de esta quinasa aún no se han reportado. De manera interesante, las subunidades que componen el RGli poseen un dominio intracelular largo entre los dominios transmembrana 3 y 4, este dominio es el que presenta la mayor variabilidad entre las diferentes subunidades, donde por ejemplo mientras la subunidad  $\beta$  tiene un DIC de 162 aa, las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 3L$  poseen 91 aa y subunidad  $\alpha 3K$  76 aa (Langlhofer & Villmann., 2016). La variabilidad en este dominio intracelular se ha asociado a diferentes modificaciones postraduccionales, las cuales pueden modificar de manera particular a una subunidad u otra la función, expresión y localización

subcelular (Specht et al., 2011; Breitinger et al., 2018; Zhang et al., 2019; Moraga-Cid et al., 2020; Zeilhofer et al., 2021; San Martin et al., 2022).

En nuestro caso, al cuantificar la fluorescencia asociada a los  $\alpha 1$ -RGli homéricos no se observó una diferencia significativa entre las condiciones control y activación de Cdk5 (**Figura 7B**). Los resultados obtenidos al analizar RGli homoméricos compuestos por la subunidad  $\alpha 1$ , que posee la secuencia  $^{408}\text{SP}^{409}$  (secuencia SP, **Figura 4**), sugieren que la activación de Cdk5 no modifica la expresión y localización subcelular de RGli recombinantes expresados en células HEK293. Estudios bioinformáticos sobre las secuencias de los sustratos de Cdk5 muestran que solo un 49% de estos poseen la secuencia consenso completa de Cdk5 por lo que las probabilidades de que Cdk5 no modulara a  $\alpha 1$  eran altas (Borquez et al., 2013). Sin embargo, conociendo los porcentajes de los sustratos que no poseen el sitio consenso completo y teniendo en cuenta las restricciones de nuestros análisis, donde solo se observó la expresión del receptor, no podemos descartar una potencial modulación de Cdk5 en la actividad de este canal homomérico, sobre todo considerando los estudios previos de nuestro grupo que reportaron la modificación de la conductancia de  $\alpha 3$ -RGli por fosforilación de PKA del residuo serina 346 (S346), lo que ocurre sin cambios detectables en la expresión del receptor (Moraga-Cid et al., 2020). Si bien es nuestra primera aproximación para denominar a  $\alpha 1$ -RGli como sustrato de Cdk5, futuros experimentos funcionales y bioquímicos nos permitirán clarificar si Cdk5 puede o no fosforilar  $\alpha 1$ -RGli en la secuencia  $^{408}\text{SP}^{409}$  y modular su función.

Para el caso de heteropentameros de RGlI, los resultados obtenidos mostraron un aumento significativo en la expresión de  $\beta$ -RGlI al activar Cdk5, aumento observado tanto en células permeabilizadas como en células sin permeabilizar, sugiriendo así a la subunidad  $\beta$  como un posible sustrato para la actividad quinasa de Cdk5 promoviendo un aumento en la expresión total de  $\alpha 1\beta$ -RGlI, sin descartar la posibilidad de una proteína intermediaria que pudiera promover el aumento en la expresión o estabilidad de esta subunidad. Una explicación para esta diferencia entre la subunidad  $\alpha 1$  y la subunidad  $\beta$ , es que esta última tiene un sitio putativo canónico completo ( $^{391}\text{TPVH}^{394}$ ) para Cdk5 (**Figura 4**), mientras que la subunidad  $\alpha 1$  solo posee una secuencia mínima (SP) para la acción de Cdk5. En este contexto, la variabilidad del DIC de las subunidades produce diferencias en los patrones de fosforilación, donde por ejemplo la subunidad  $\alpha 1$ ins presenta sitio de fosforilación para la actividad de PKA, mientras la subunidad  $\alpha 1$  no (Lynch, 2004). En este contexto las subunidades  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  y  $\beta$  también poseen sitios para la actividad de PKA (Heindl et al., 2007). Así, las diferencias observadas entre RGlI homo y heteropentameros se podrían explicar a partir de la diferencia en la secuencia de su DMT, donde  $\beta$  posee la secuencia consenso completa, mientras la subunidad  $\alpha 1$  solo la secuencia parcial.

Para determinar si el aumento en la fluorescencia de  $\alpha 1\beta$ -RGlI se debía a un aumento en la actividad de Cdk5, se utilizó el inhibidor roscovitina como tratamiento. Los datos obtenidos en esta actividad indican que los efectos de la activación de Cdk5 por p35 pueden ser atenuados al tratar las células con un inhibidor de esta quinasa, lo que nos permiten sugerir que el aumento en



la expresión de  $\alpha 1\beta$ -RGli es mediado por la actividad quinasa de Cdk5 y probablemente a partir de la fosforilación en la T391 del DIC de la subunidad  $\beta$ . Así una fosforilación mediada por Cdk5 en la subunidad  $\beta$  de RGli promovería un aumento en la expresión total del receptor en células HEK293.

La literatura en conjunto con nuestros datos permite determinar un rol determinante en la fosforilación como moduladores en la expresión subcelular de RGli, sin embargo, para nuestro caso ensayos adicionales son necesarios, por ejemplo, realizar un control con subunidades  $\beta$  mutadas (i.e. T $\rightarrow$ A), donde el sitio consenso de acción de Cdk5 se eliminaría, pudieran contribuir a una mayor comprensión de los mecanismos relacionados a este fenómeno.

Aun cuando la estequiometría  $\alpha 1\beta$ -RGli parece ser determinante en la sinapsis mediada por glicina, los heteropentámeros de  $\alpha 2\beta$  y  $\alpha 3\beta$  juegan un rol fundamental en el SNC (Winkelmann et al., 2014; Chen et al., 2022). Las fosforilaciones en estas subunidades han denotado variaciones en la actividad del canal (Han et al., 2013; Islam et al., 2018). Ambas subunidades poseen el sitio consenso de acción de PKA (RESR) (Harvey et al., 2004). Al analizar una mutación fosfomimética de  $\alpha 2$  se observó una disminución en las corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSC) (Islam et al., 2018). Mientras la subunidad  $\alpha 3$  se ha asociado con el dolor inflamatorio a partir de una reducción en las corrientes inhibitorias mediadas por esta subunidad (Harvey et al., 2004). De esta forma la fosforilación y la consecuente variación en la funcionalidad de estos canales es de importancia por su implicancia en la participación de esta modificación postraduccional y su asociación con

diferentes patologías como el dolor, esquizofrenia y autismo (Harvey et al., 2004; Pilorge et al., 2016; Chen et al., 2022).

En este aspecto, es altamente sabido que el dominio intracelular de los pLGICs es blanco de diferentes modificaciones postraduccionales, sin embargo, este dominio es el menos conservado en esta familia de receptores. Los dominios intracelulares de las subunidades de RGli varían tanto en largo como en la secuencia de aminoácidos donde  $\alpha 2$  posee 83aa y  $\alpha 3$  posee 91aa (Langlhofer & Villmann., 2016). Al analizar la fluorescencia asociada a los receptores heteropentaméricos  $\alpha 2\beta$ -RGli, en condiciones de activación co-transfectados con p35/GFP se observa un aumento significativo al cuantificar las imágenes obtenidas, mientras en el caso de la configuración  $\alpha 3\beta$ -RGli, esta no varía de manera significativa al co-transfectar con p35/GFP (**Figura 13**). En esta línea, y notando la diferencia en el DIC de RGli, diferentes reportes denotan la importancia de presencia o ausencia de sitios consenso, donde por ejemplo la subunidad  $\alpha 1$ ins puede ser regulada por la vía ERK mientras, la subunidad  $\alpha 1$ , con 8aa menos, se ve afectada por esta quinasa al no poseer el sitio consenso (Zhang et al., 2019). De la misma forma la PKA puede modular tanto  $\alpha 1$ ins,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ , pero no a la subunidad  $\alpha 1$  (Heindl et al., 2007). La actividad de Cdk5 actúa de manera similar en otros canales donde la configuración P2X2a del receptor purinérgico P2X puede ver modulada su desensibilización mientras la variante P2X2b, generada a partir de un “splicing alternativo” pierde este sitio consenso y no se ven cambios en la funcionalidad de esta variante (Coddou et al., 2017). Sin embargo, para dilucidar la participación de Cdk5 en la modulación de  $\alpha 3\beta$ -RGli más

experimentos son necesarios, ya que como se observa en la Figura 13, los datos presentan una alta variabilidad.

### **Estudio de la modulación de RGli nativo por Cdk5 en cultivos primarios espinales.**

Es altamente conocido que el mantenimiento de la excitabilidad neuronal es esencial para el correcto funcionamiento del sistema nervioso (Langlhofer & Villmann., 2016). Las sinapsis inhibitorias están encargadas de modular la excitabilidad neuronal mediante la hiperpolarización de la membrana (Chen et al., 2022). En este aspecto la localización de los receptores  $\alpha 1\beta$ -RGli postsinápticos cumple un rol fundamental en el desarrollo de su función, donde deben estar ubicados de manera específica en oposición al sitio de liberación del neurotransmisor y deben estar concentrados en forma de “*clusters*”. Estas agrupaciones son formadas a partir de la interacción del DIC de la subunidad  $\beta$  con la proteína de andamiaje gefirina (Kim et al., 2006; Petrini and Barberis., 2014; Grünwald et al., 2018). En este contexto, quisimos analizar si la sobreactivación de Cdk5 produciría cambios en la expresión de RGli, condición donde observamos una disminución en la fluorescencia asociada a RGli nativos en los somas neuronales (**Figura 14**). Los estudios mencionados anteriormente muestran como RGli puede ver modulada su expresión y localización subcelular a partir de fosforilaciones en los dominios intracelulares de sus subunidades, donde la actividad de Cdk5 podría denotar una nueva forma de regulación de la expresión de RGli (Breitinger et al., 2018; Zhang et al.,

2019). Estudios futuros son necesarios para determinar qué tipo de interacción tienen RGlI-Cdk5, donde a partir de la literatura es posible que la fosforilación del dominio intracelular de RGlI posiblemente pueda gatillar una señalización de ubiquitinación (Zhang et al., 2019), cambios en la conformación del receptor (Han et al., 2013; Islam et al., 2018), una disminución en la interacción RGlI-Gefirina (Specht et al., 2011), promoviendo la deslocalización del RGlI evitando su expresión en el soma (región donde analizamos la fluorescencia) y promoviendo su expresión en las dendritas (Langhofer & Villmann., 2016). Así, a partir de estas posibilidades, son necesarios más experimentos para determinar la relevancia de la potencial interacción RGlI-Cdk5.

De manera contraria, al analizar los datos sobre la inhibición de la actividad basal de Cdk5, no se observan variaciones significativas en la fluorescencia asociado a RGlI (**Figura 15**), lo que nos estaría sugiriendo que, aun cuando las funciones de Cdk5/p35 son variadas, en condiciones basales RGlI no sería un sustrato para la actividad de Cdk5 (Tomizawa et al., 2002). Previamente se ha reportado que una hiperactividad de Cdk5 o el clivaje de su activador p35, promueve una actividad deslocalizada/desregulada de Cdk5, lo que provoca la hiperfosforilación de sus sustratos, así como también la fosforilación de sustratos no fisiológicos (Chang et al., 2011). En este aspecto, al promover la sobreexpresión de p35, y por ende una hiper actividad de Cdk5 es posible que RGlI se convierta en un sustrato para Cdk5, provocando la fosforilación del receptor.

La actividad de Cdk5 ha sido altamente asociada a la vía de señalización nociceptiva (Gomez et al., 2020). En este aspecto se ha

reportado por ejemplo que un aumento en la expresión de Cdk5 y su activador p35 promueven una hiperalgesia al calor a partir de su actividad sobre el receptor TRPV1 (Pareek et al., 2007; Yang et al., 2007). También la fosforilación del canal  $Ca_v3.2$  estaría promoviendo la expresión de este canal en la membrana aumentando el influjo de calcio y la excitabilidad en neuronas sensoriales (Gomez., 2020), donde se ha observado que la inhibición de Cdk5 reduce la alodinia mecánica en ratas SNL (Gomez., 2020). En el contexto del dolor, la actividad inhibitoria de RGli espinales cumple un rol fundamental en la regulación de estímulos nocivos en el SNC (San Martin et al., 2022). Estudios recientes denotan una internalización y endocitosis de RGlis a partir de una fosforilación por ERK en la subunidad  $\alpha 1$ ins, donde también se sugiere una ubiquitinación, disminuyendo la presencia de RGlis y por consiguiente una disminución en las corrientes glicinérgicas promoviendo la señalización de dolor (Zhang et al., 2019). La subunidad  $\alpha 3$  de RGli está altamente asociada al dolor inflamatorio, donde una fosforilación mediada por PKA disminuyendo las IPSCs (Harvey et al., 2004). En este contexto el receptor de glicina se presenta como potenciales blancos farmacológicos para patologías como el dolor, donde Cdk5 también está altamente implicado (Gomez., 2020). Dicho esto, nuestros resultados están en concordancia con la actividad de Cdk5 y reportes previos de RGlis fosforilados. A partir de la disminución en la expresión de RGli en cultivos primarios espinales, es posible sugerir una disminución también en la actividad glicinérgica de esta región donde una modulación por Cdk5 formaría parte de un nuevo mecanismo fisiopatológico que involucraría la interacción Cdk5-RGli.

De esta forma, los resultados obtenidos en esta investigación sugieren una interacción funcional entre Cdk5 y RGli, modulando la expresión y localización subcelular de RGlis recombinantes y nativos, ya sea a través de un intermediario o de manera directa. Aun cuando más experimentos son necesarios para determinar si  $\beta$ -RGli es directamente fosforilado o no, nuestros datos sugieren a  $\beta$ -RGli como un nuevo blanco molecular para la señalización mediada por Cdk5/p35.

## CONCLUSIONES

A partir de los datos obtenidos desde células HEK 293, es posible concluir que la activación de Cdk5 aumentó la expresión de RGli heteroméricos compuestos por la subunidad  $\alpha 1\beta$  o  $\alpha 2\beta$ , mientras que, por otra parte, la expresión de RGli recombinantes compuestos por la subunidad  $\alpha 1$  y  $\alpha 3\beta$  no fue alterada. Sin embargo, los estudios en cultivos de neuronas espinales mostraron que la activación de Cdk5 disminuyó la expresión de RGli, mientras que la inhibición de esta quinasa no generó variaciones significativas. En líneas generales, nuestros resultados sugieren que la expresión del RGli es, al menos en parte, regulada por la actividad de Cdk5, lo que podría tener implicancias importantes en el control glicinérgico de la excitabilidad neuronal. A pesar de que nuestros experimentos no permiten concluir si los RGli son directamente fosforilados por Cdk5, nuestros análisis de secuencia permiten sugerir que probablemente Cdk5 fosforila la subunidad  $\beta$  en el residuo de treonina  $^{391}\text{T}$ , el cual se encuentra dentro de la secuencia canónica  $^{391}\text{TPVH}$ . Futuros experimentos bioquímicos y moleculares podrán confirmar si los RGli son sustratos de Cdk5.

## REFERENCIAS

- Aboheimed, G. I., AlRasheed, M. M., Almudimeegh, S., Peña-Guerra, K. A., Cardona-Londoño, K. J., Salih, M. A., ... & Ruiz, A. J. (2022). Clinical, genetic, and functional characterization of the glycine receptor  $\beta$ -subunit A455P variant in a family affected by hyperekplexia syndrome. *Journal of Biological Chemistry*, 298(7):102018. doi: 10.1016/j.jbc.2022.102018.
- Allnutt AB, Waters AK, Kesari S, Yenugonda VM. Physiological and Pathological Roles of Cdk5: Potential Directions for Therapeutic Targeting in Neurodegenerative Disease. *ACS Chem Neurosci*. 2020 May 6;11(9):1218-1230. doi: 10.1021/acchemneuro.0c00096.
- Aprison, M. H., 1990, The discovery of the neurotransmitter role of glycine; In *Glycine Neurotransmission*, O. P. Ottersen and J. Storm-Mathisen, eds (New York: John Wiley and Sons), pp. 1Ð 24
- Aroeira, R. I., Ribeiro, J. A., Sebastião, A. M., and Valente, C. A. (2011). Age-related changes of glycine receptor at the rat hippocampus: from the embryo to the adult. *J. Neurochem*. 118, 339–353. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07197.x
- Avraham, E., Rott, R., Liani, E., Szargel, R., and Engelender, S. (2007). Phosphorylation of Parkin by the cyclin-dependent kinase 5 at the linker region modulates its ubiquitin-ligase activity and aggregation. *J. Biol. Chem*. 282, 12842–12850. doi: 10.1074/jbc.M608243200



- Betz H, Laube B. Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J Neurochem.* 2006 Jun;97(6):1600-10. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03908.x
- Bórquez DA, Olmos C, Álvarez S, Di Genova A, Maass A, González-Billault C. Bioinformatic survey for new physiological substrates of Cyclin-dependent kinase 5. *Genomics.* 2013 Apr;101(4):221-8. doi: 10.1016/j.ygeno.2013.01.003.
- Bourinet E, Altier C, Hildebrand ME, Trang T, Salter MW, Zamponi GW. Calcium-permeable ion channels in pain signaling. *Physiol Rev.* 2014 Jan;94(1):81-140. doi: 10.1152/physrev.00023.2013.
- Breitinger HG, Becker CM. The inhibitory glycine receptor-simple views of a complicated channel. *Chembiochem.* 2002 Nov 4;3(11):1042-52. doi: 10.1002/1439-7633(20021104)3:11<1042::AID-CBIC1042>3.0.CO;2-7
- Breitinger U, Bahnassawy LM, Janzen D, Roemer V, Becker CM, Villmann C, Breitinger HG. PKA and PKC Modulators Affect Ion Channel Function and Internalization of Recombinant Alpha1 and Alpha1-Beta Glycine Receptors. *Front Mol Neurosci.* 2018 May 14;11:154. doi: 10.3389/fnmol.2018.00154.
- Breitinger, U. and Breitinger, H. G. (2020) Modulators of the Inhibitory Glycine Receptor. *ACS Chem. Neurosci.* 11 (12), 1706– 1725, DOI: 10.1021/acscchemneuro.0c00054
- Breitinger U, Weinländer K, Pechmann Y, Langlhofer G, Enz R, Becker CM, Sticht H, Kneussel M, Villmann C, Breitinger HG. A proline-rich motif in the large intracellular loop of the glycine receptor  $\alpha 1$  subunit

interacts with the Pleckstrin homology domain of collybistin. *J Adv Res.* 2020 Oct 8;29:95-106. doi: 10.1016/j.jare.2020.09.009.

Brittain JM, Piekarz AD, Wang Y, Kondo T, Cummins TR, Khanna R. An atypical role for collapsin response mediator protein 2 (CRMP-2) in neurotransmitter release via interaction with presynaptic voltage-gated calcium channels. *J Biol Chem.* 2009 Nov 6;284(45):31375-90. doi: 10.1074/jbc.M109.009951.

Brittain JM, Duarte DB, Wilson SM, Zhu W, Ballard C, Johnson PL, Liu N, Xiong W, Ripsch MS, Wang Y, Fehrenbacher JC, Fitz SD, Khanna M, Park CK, Schmutzler BS, Cheon BM, Due MR, Brustovetsky T, Ashpole NM, Hudmon A, Meroueh SO, Hingtgen CM, Brustovetsky N, Ji RR, Hurley JH, Jin X, Shekhar A, Xu XM, Oxford GS, Vasko MR, White FA, Khanna R. Suppression of inflammatory and neuropathic pain by uncoupling CRMP-2 from the presynaptic Ca<sup>2+</sup> channel complex. *Nat Med.* 2011 Jun 5;17(7):822-9. doi: 10.1038/nm.2345.

Burgos CF, Yévenes GE, Aguayo LG. Structure and Pharmacologic Modulation of Inhibitory Glycine Receptors. *Mol Pharmacol.* 2016 Sep;90(3):318-25. doi: 10.1124/mol.116.105726.

Caraiscos VB, Mihic SJ, MacDonald JF, Orser BA. Tyrosine kinases enhance the function of glycine receptors in rat hippocampal neurons and human alpha(1)beta glycine receptors. *J Physiol.* 2002 Mar 1;539(Pt 2):495-502. doi: 10.1113/jphysiol.2001.013508.

Caterina MJ, Julius D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:487-517. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.487.

- Chang KH, Multani PS, Sun KH, Vincent F, de Pablo Y, Ghosh S, Gupta R, Lee HP, Lee HG, Smith MA, Shah K. Nuclear envelope dispersion triggered by deregulated Cdk5 precedes neuronal death. *Mol Biol Cell*. 2011 May;22(9):1452-62. doi: 10.1091/mbc.E10-07-0654.
- Chen X, Wilson KA, Schaefer N, De Hayr L, Windsor M, Scalais E, van Rijckevorsel G, Stouffs K, Villmann C, O'Mara ML, Lynch JW, Harvey RJ. Loss, Gain and Altered Function of GlyR  $\alpha$ 2 Subunit Mutations in Neurodevelopmental Disorders. *Front Mol Neurosci*. 2022 Apr 29;15:886729. doi: 10.3389/fnmol.2022.886729.
- Cheng, L., Chen, K., Li, J. et al. Phosphorylation of CRMP2 by Cdk5 Negatively Regulates the Surface Delivery and Synaptic Function of AMPA Receptors. *Mol Neurobiol* 59, 762–777 (2022). <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02581-w>
- Chéry N, de Koninck Y. Junctional versus extrajunctional glycine and GABA(A) receptor-mediated IPSCs in identified lamina I neurons of the adult rat spinal cord. *J Neurosci*. 1999 Sep 1;19(17):7342-55. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-17-07342.1999.
- Choi HS, Chung SH. Roscovitine increases intracellular calcium release and capacitative calcium entry in PC12 cells. *Neurosci Lett*. 2010 Jan 18;469(1):141-4. doi: 10.1016/j.neulet.2009.11.061.
- Choi G, Ko J. Gephyrin: a central GABAergic synapse organizer. *Exp Mol Med*. 2015 Apr 17;47:e158. doi: 10.1038/emm.2015.5.
- Chung SK, Vanbellinghen JF, Mullins JG, Robinson A, Hantke J, Hammond CL, Gilbert DF, Freilinger M, Ryan M, Kruer MC, Masri A, Gurses C, Ferrie C, Harvey K, Shiang R, Christodoulou J, Andermann

- F, Andermann E, Thomas RH, Harvey RJ, Lynch JW, Rees MI. Pathophysiological mechanisms of dominant and recessive GLRA1 mutations in hyperekplexia. *J Neurosci*. 2010 Jul 14;30(28):9612-20. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1763-10.2010.
- Chung, S.-K., Bode, A., Cushion, T. D., Thomas, R. H., Hunt, C., Wood, S.-E., ... Rees, M. I. (2012). GLRB is the third major gene of effect in hyperekplexia. *Human Molecular Genetics*, 22(5), 927–940. doi:10.1093/hmg/dds498
- Cicenas J, Kalyan K, Sorokinas A, Stankunas E, Levy J, Meskinyte I, Stankevicius V, Kaupinis A, Valius M. Roscovitine in cancer and other diseases. *Ann Transl Med*. 2015 Jun;3(10):135. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.61.
- Coddou C, Sandoval R, Castro P, Lazcano P, Hevia MJ, Rokic M, Hall B, Terse A, Gonzalez-Billault C, Kulkarni AB, Stojilkovic SS, Utreras E. Cyclin-dependent kinase 5 modulates the P2X2a receptor channel gating through phosphorylation of C-terminal threonine 372. *Pain*. 2017 Nov;158(11):2155-2168. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001021.
- daCosta CJ, Baenziger JE. Gating of pentameric ligand-gated ion channels: structural insights and ambiguities. *Structure*. 2013 Aug 6;21(8):1271-83. doi: 10.1016/j.str.2013.06.019.
- Davies JS, Chung SK, Thomas RH, Robinson A, Hammond CL, Mullins JG, Carta E, Pearce BR, Harvey K, Harvey RJ, Rees MI. The glycinergic system in human startle disease: a genetic screening approach. *Front Mol Neurosci*. 2010 Mar 23;3:8. doi: 10.3389/fnmol.2010.00008.

- Dhavan R, Tsai LH. A decade of CDK5. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Oct;2(10):749-59. doi: 10.1038/35096019.
- Diao XT, Yao L, Ma JJ, Zhang TY, Bai HH, Suo ZW, Yang X, Hu XD. Analgesic action of adenosine A1 receptor involves the dephosphorylation of glycine receptor  $\alpha$ 1 subunit in spinal dorsal horn of mice. *Neuropharmacology.* 2020 Oct 1;176:108219. doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.108219.
- Dolphin AC. Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology. *J Physiol.* 2016 Oct 1;594(19):5369-90. doi: 10.1113/JP272262.
- Dumoulin, A. (2009). Cellular transport and membrane dynamics of the glycine receptor. *Frontiers in Molecular Neuroscience.* doi:10.3389/neuro.02.028.2009
- Durisic N, Godin AG, Wever CM, Heyes CD, Lakadamyali M, Dent JA. Stoichiometry of the human glycine receptor revealed by direct subunit counting. *J Neurosci.* 2012 Sep 12;32(37):12915-20. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2050-12.2012.
- Dutertre, S., Becker, C.-M., & Betz, H. (2012). Inhibitory Glycine Receptors: An Update. *Journal of Biological Chemistry*, 287(48), 40216–40223. doi:10.1074/jbc.r112.408229
- Eichler SA, Kirischuk S, Jüttner R, Schaefermeier PK, Legendre P, Lehmann TN, Gloveli T, Grantyn R, Meier JC. Glycinergic tonic inhibition of hippocampal neurons with depolarizing GABAergic transmission elicits histopathological signs of temporal lobe epilepsy. *J*

- Cell Mol Med. 2008 Dec;12(6B):2848-66. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00357.x.
- Enserink JM, Kolodner RD. An overview of Cdk1-controlled targets and processes. Cell Div. 2010 May 13;5:11. doi: 10.1186/1747-1028-5-11.
- Ford CF, Suominen I, Glatz CE. Fusion tails for the recovery and purification of recombinant proteins. Protein Expr Purif. 1991 Apr-Jun;2(2-3):95-107. doi: 10.1016/1046-5928(91)90057-p.
- Fritschy JM, Harvey RJ, Schwarz G. Gephyrin: where do we stand, where do we go? Trends Neurosci. 2008 May;31(5):257-64. doi: 10.1016/j.tins.2008.02.006.
- Gamlin CR, Yu WQ, Wong ROL, Hoon M. Assembly and maintenance of GABAergic and Glycinergic circuits in the mammalian nervous system. Neural Dev. 2018 Jun 7;13(1):12. doi: 10.1186/s13064-018-0109-6.
- Gomez K, Calderón-Rivera A, Sandoval A, González-Ramírez R, Vargas-Parada A, Ojeda-Alonso J, Granados-Soto V, Delgado-Lezama R, Felix R. Cdk5-Dependent Phosphorylation of CaV3.2 T-Type Channels: Possible Role in Nerve Ligation-Induced Neuropathic Allodynia and the Compound Action Potential in Primary Afferent C Fibers. J Neurosci. 2020 Jan 8;40(2):283-296. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0181-19.2019.
- Gomez K, Vallecillo TGM, Moutal A, Perez-Miller S, Delgado-Lezama R, Felix R, Khanna R. The role of cyclin-dependent kinase 5 in neuropathic pain. Pain. 2020 Dec;161(12):2674-2689. doi: 10.1097/j.pain.0000000000002027.

- Grünewald N, Jan A, Salvatico C, Kress V, Renner M, Triller A, Specht CG, Schwarz G. Sequences Flanking the Gephyrin-Binding Site of GlyR $\beta$  Tune Receptor Stabilization at Synapses. *eNeuro*. 2018 Feb 19;5(1):ENEURO.0042-17.2018. doi: 10.1523/ENEURO.0042-17.2018.
- Guo X, Wecker L. Identification of three cAMP-dependent protein kinase (PKA) phosphorylation sites within the major intracellular domain of neuronal nicotinic receptor  $\alpha 4$  subunits. *J Neurochem*. 2002 Jul;82(2):439-47. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.01027.x.
- Han L, Talwar S, Wang Q, Shan Q, Lynch JW. Phosphorylation of  $\alpha 3$  glycine receptors induces a conformational change in the glycine-binding site. *ACS Chem Neurosci*. 2013 Oct 16;4(10):1361-70. doi: 10.1021/cn400097j.
- Harvey RJ, Depner UB, Wässle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, Smart TG, Harvey K, Schütz B, Abo-Salem OM, Zimmer A, Poisbeau P, Welzl H, Wolfer DP, Betz H, Zeilhofer HU, Müller U. GlyR  $\alpha 3$ : an essential target for spinal PGE<sub>2</sub>-mediated inflammatory pain sensitization. *Science*. 2004 May 7;304(5672):884-7. doi: 10.1126/science.1094925.
- Haverkamp S, Müller U, Zeilhofer HU, Harvey RJ, Wässle H. Diversity of glycine receptors in the mouse retina: localization of the  $\alpha 2$  subunit. *J Comp Neurol*. 2004 Sep 27;477(4):399-411. doi: 10.1002/cne.20267.
- He, R., Huang, W., Huang, Y., Xu, M., Song, P., Huang, Y., ... Hu, Y. (2018). Cdk5 Inhibitory Peptide Prevents Loss of Dopaminergic Neurons and Alleviates Behavioral Changes in an MPTP Induced

- Parkinson's Disease Mouse Model. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10. doi:10.3389/fnagi.2018.00162
- Heindl, C., Brune, K., and Renner, B. (2007). Kinetics and functional characterization of the glycine receptor  $\alpha 2$  and  $\alpha 3$  subunit. *Neurosci. Lett.* 429, 59–63. doi: 10.1016/j.neulet.2007.10.001
- Hellmich MR, Pant HC, Wada E, Battey JF. Neuronal cdc2-like kinase: a cdc2-related protein kinase with predominantly neuronal expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Nov 15;89(22):10867-71. doi: 10.1073/pnas.89.22.10867.
- Hruskova B, Trojanova J, Kulik A, Kralikova M, Pysanenko K, Bures Z, Syka J, Trussell LO, Turecek R. Differential distribution of glycine receptor subtypes at the rat calyx of Held synapse. *J Neurosci.* 2012 Nov 21;32(47):17012-24. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1547-12.2012.
- Huang R, He S, Chen Z, Dillon GH, Leidenheimer NJ. Mechanisms of homomeric  $\alpha 1$  glycine receptor endocytosis. *Biochemistry.* 2007 Oct 16;46(41):11484-93. doi: 10.1021/bi701093j.
- Hwang O. Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Exp Neurobiol.* 2013 Mar;22(1):11-7. doi: 10.5607/en.2013.22.1.11.
- Illes P, Müller CE, Jacobson KA, Grutter T, Nicke A, Fountain SJ, Kennedy C, Schmalzing G, Jarvis MF, Stojilkovic SS, King BF, Di Virgilio F. Update of P2X receptor properties and their pharmacology: IUPHAR Review 30. *Br J Pharmacol.* 2021 Feb;178(3):489-514. doi: 10.1111/bph.15299.



- Imboden, M., Devignot, V., Korn, H., & Goblet, C. (2001). Regional distribution of glycine receptor messenger RNA in the central nervous system of zebrafish. *Neuroscience*, 103(3), 811–830. doi:10.1016/s0306-4522(00)00576-5
- Islam S, Chen X, Estrada-Mondragon A, Lynch JW. Phosphorylation of the  $\alpha 2$  glycine receptor induces an extracellular conformational change and slows the rise and decay rates of glycinergic synaptic currents. bioRxiv; 2018. doi: 10.1101/434357.
- Ivica, J., Lape, R., Jazbec, V., Yu, J., Zhu, H., Gouaux, E., ... & Sivilotti, L. G. (2021). The intracellular domain of homomeric glycine receptors modulates agonist efficacy. *Journal of Biological Chemistry*, 296.
- Jaiteh M, Taly A, Hénin J. Evolution of Pentameric Ligand-Gated Ion Channels: Pro-Loop Receptors. *PLoS One*. 2016 Mar 17;11(3):e0151934. doi: 10.1371/journal.pone.0151934.
- James VM, Bode A, Chung SK, Gill JL, Nielsen M, Cowan FM, Vujic M, Thomas RH, Rees MI, Harvey K, Keramidas A, Topf M, Ginjaar I, Lynch JW, Harvey RJ. Novel missense mutations in the glycine receptor  $\beta$  subunit gene (GLRB) in startle disease. *Neurobiol Dis*. 2013 Apr;52:137-49. doi: 10.1016/j.nbd.2012.12.001.
- Liu J, Du J, Yang Y, Wang Y. Phosphorylation of TRPV1 by cyclin-dependent kinase 5 promotes TRPV1 surface localization, leading to inflammatory thermal hyperalgesia. *Exp Neurol*. 2015 Nov;273:253-62. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.09.005.
- Brittain JM, Wang Y, Eruvwetere O, Khanna R. Cdk5-mediated phosphorylation of CRMP-2 enhances its interaction with CaV2.2.

- FEBS Lett. 2012 Nov 2;586(21):3813-8. doi: 10.1016/j.febslet.2012.09.022.
- Kapitein LC, Hoogenraad CC. Building the Neuronal Microtubule Cytoskeleton. *Neuron*. 2015 Aug 5;87(3):492-506. doi: 10.1016/j.neuron.2015.05.046.
- Kasaragod VB and Schindelin H (2018) Structure–Function Relationships of Glycine and GABAA Receptors and Their Interplay with the Scaffolding Protein Gephyrin. *Front. Mol. Neurosci.* 11:317. doi: 10.3389/fnmol.2018.00317
- Kim EY, Schrader N, Smolinsky B, Bedet C, Vannier C, Schwarz G, Schindelin H. Deciphering the structural framework of glycine receptor anchoring by gephyrin. *EMBO J.* 2006 Mar 22;25(6):1385-95. doi: 10.1038/sj.emboj.7601029.
- Kirsch J, Kuhse J, Betz H. Targeting of glycine receptor subunits to gephyrin-rich domains in transfected human embryonic kidney cells. *Mol Cell Neurosci.* 1995 Oct;6(5):450-61. doi: 10.1006/mcne.1995.1033.
- Kling C, Koch M, Saul B, Becker CM. The frameshift mutation oscillator (Glr1(sp-d-ot)) produces a complete loss of glycine receptor alpha1-polypeptide in mouse central nervous system. *Neuroscience.* 1997 May;78(2):411-7. doi: 10.1016/s0306-4522(96)00567-2.
- Ko J, Humbert S, Bronson RT, Takahashi S, Kulkarni AB, Li E, Tsai LH. p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment. *J Neurosci.* 2001 Sep 1;21(17):6758-71. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-17-06758.2001.

- Kumar S, Suryanarayanan A, Boyd KN, Comerford CE, Lai MA, Ren Q, Morrow AL. Ethanol reduces GABAA alpha1 subunit receptor surface expression by a protein kinase Cgamma-dependent mechanism in cultured cerebral cortical neurons. *Mol Pharmacol.* 2010 May;77(5):793-803. doi: 10.1124/mol.109.063016.
- Kusakawa G, Saito T, Onuki R, Ishiguro K, Kishimoto T, Hisanaga S. Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25. *J Biol Chem.* 2000 Jun 2;275(22):17166-72. doi: 10.1074/jbc.M907757199.
- Lai KO, Ip NY. Recent advances in understanding the roles of Cdk5 in synaptic plasticity. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Aug;1792(8):741-5. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.05.001.
- Langlhofer G and Villmann C (2016) The Intracellular Loop of the Glycine Receptor: It's not all about the Size. *Front. Mol. Neurosci.* 9:41. doi: 10.3389/fnmol.2016.00041
- Lara, C. O., Murath, P., Muñoz, B., Marileo, A. M., Martín, L. S., San Martín, V. P., Burgos, C. F., Mariqueo, T. A., Aguayo, L. G., Fuentealba, J., Godoy, P., Guzman, L., and Yévenes, G. E. (2016) Functional modulation of glycine receptors by the alkaloid gelsemine. *British Journal of Pharmacology*, 173: 2263– 2277. doi: 10.1111/bph.13507.
- Lara, C. O., Burgos, C. F., Silva-Grecchi, T., Muñoz-Montesino, C., Aguayo, L. G., Fuentealba, J., et al. (2019). Large Intracellular Domain-Dependent Effects of Positive Allosteric Modulators on Glycine

- Receptors. *ACS Chem. Neurosci.* 10, 2551–2559. doi: 10.1021/acscchemneuro.9b00050
- Legendre P, Muller E, Badiu CI, Meier J, Vannier C, Triller A. Desensitization of homomeric  $\alpha 1$  glycine receptor increases with receptor density. *Mol Pharmacol.* 2002 Oct;62(4):817-27. doi: 10.1124/mol.62.4.817.
- Li, B.-S., Sun, M.-K., Zhang, L., Takahashi, S., Ma, W., Vinade, L., ... Pant, H. C. (2001). Regulation of NMDA receptors by cyclin-dependent kinase-5. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(22), 12742–12747. doi:10.1073/pnas.211428098
- Liman J, Deeg S, Voigt A, Voßfeldt H, Dohm CP, Karch A, Weishaupt J, Schulz JB, Bähr M, Kermer P. CDK5 protects from caspase-induced Ataxin-3 cleavage and neurodegeneration. *J Neurochem.* 2014 Jun;129(6):1013-23. doi: 10.1111/jnc.12684.
- Lopes JP, Agostinho P. Cdk5: multitasking between physiological and pathological conditions. *Prog Neurobiol.* 2011 Jun;94(1):49-63. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.03.006.
- Lundby A, Secher A, Lage K, Nordsborg NB, Dmytriyev A, Lundby C, Olsen JV. Quantitative maps of protein phosphorylation sites across 14 different rat organs and tissues. *Nat Commun.* 2012 Jun 6;3:876. doi: 10.1038/ncomms1871.
- Lynch JW. Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev.* 2004 Oct;84(4):1051-95. doi: 10.1152/physrev.00042.2003.

- Lynch JW. Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology*. 2009 Jan;56(1):303-9. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.07.034.
- Malosio ML, Grenningloh G, Kuhse J, Schmieden V, Schmitt B, Prior P, Betz H. Alternative splicing generates two variants of the alpha 1 subunit of the inhibitory glycine receptor. *J Biol Chem*. 1991 Feb 5;266(4):2048-53.
- Maric HM, Hausrat TJ, Neubert F, Dalby NO, Doose S, Sauer M, Kneussel M, Strømgaard K. Gephyrin-binding peptides visualize postsynaptic sites and modulate neurotransmission. *Nat Chem Biol*. 2017 Feb;13(2):153-160. doi: 10.1038/nchembio.2246.
- McColgan P, Tabrizi SJ. Huntington's disease: a clinical review. *Eur J Neurol*. 2018 Jan;25(1):24-34. doi: 10.1111/ene.13413.
- Meier JC, Henneberger C, Melnick I, Racca C, Harvey RJ, Heinemann U, Schmieden V, Grantyn R. RNA editing produces glycine receptor alpha3(P185L), resulting in high agonist potency. *Nat Neurosci*. 2005 Jun;8(6):736-44. doi: 10.1038/nn1467.
- Meyer G, Kirsch J, Betz H, Langosch D. Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor beta subunit. *Neuron*. 1995 Sep;15(3):563-72. doi: 10.1016/0896-6273(95)90145-0.
- Meyerson M, Enders GH, Wu CL, Su LK, Gorke C, Nelson C, Harlow E, Tsai LH. A family of human cdc2-related protein kinases. *EMBO J*. 1992 Aug;11(8):2909-17. doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05360.x.

- Mitchell EA, Gentet LJ, Dempster J, Belelli D. GABAA and glycine receptor-mediated transmission in rat lamina II neurones: relevance to the analgesic actions of neuroactive steroids. *J Physiol.* 2007 Sep 15;583(Pt 3):1021-40. doi: 10.1113/jphysiol.2007.134445.
- Moraga-Cid G, San Martín VP, Lara CO, Muñoz B, Marileo AM, Sazo A, Muñoz-Montesino C, Fuentealba J, Castro PA, Guzmán L, Burgos CF, Zeilhofer HU, Aguayo LG, Corringer PJ, Yévenes GE. Modulation of glycine receptor single-channel conductance by intracellular phosphorylation. *Sci Rep.* 2020 Mar 16;10(1):4804. doi: 10.1038/s41598-020-61677-w.
- Morelli G, Avila A, Ravanidis S, Aourz N, Neve RL, Smolders I, Harvey RJ, Rigo JM, Nguyen L, Brône B. Cerebral Cortical Circuitry Formation Requires Functional Glycine Receptors. *Cereb Cortex.* 2017 Mar 1;27(3):1863-1877. doi: 10.1093/cercor/bhw025.
- Moss SJ, Smart TG. Modulation of amino acid-gated ion channels by protein phosphorylation. *Int Rev Neurobiol.* 1996;39:1-52. doi: 10.1016/s0074-7742(08)60662-5.
- Moutal A, François-Moutal L, Perez-Miller S, Cottier K, Chew LA, Yeon SK, Dai J, Park KD, Khanna M, Khanna R. (S)-Lacosamide Binding to Collapsin Response Mediator Protein 2 (CRMP2) Regulates CaV2.2 Activity by Subverting Its Phosphorylation by Cdk5. *Mol Neurobiol.* 2016 Apr;53(3):1959-1976. doi: 10.1007/s12035-015-9141-2.
- Moutal A, Luo S, Largent-Milnes TM, Vanderah TW, Khanna R. Cdk5-mediated CRMP2 phosphorylation is necessary and sufficient for

- peripheral neuropathic pain. *Neurobiol Pain*. 2019 Jan-Jul;5:100022. doi: 10.1016/j.ynpai.2018.07.003.
- Muñoz B, Mariqueo T, Murath P, Peters C, Yevenes GE, Moraga-Cid G, Peoples RW, Aguayo LG. Modulatory Actions of the Glycine Receptor  $\beta$  Subunit on the Positive Allosteric Modulation of Ethanol in  $\alpha 2$  Containing Receptors. *Front Mol Neurosci*. 2021 Nov 18;14:763868. doi: 10.3389/fnmol.2021.763868.
- Nair A, Simonetti M, Fabbretti E, Nistri A. The Cdk5 kinase downregulates ATP-gated ionotropic P2X3 receptor function via serine phosphorylation. *Cell Mol Neurobiol*. 2010 May;30(4):505-9. doi: 10.1007/s10571-009-9483-2.
- Nemecz Á, Prevost MS, Menny A, Corringer PJ. Emerging Molecular Mechanisms of Signal Transduction in Pentameric Ligand-Gated Ion Channels. *Neuron*. 2016 May 4;90(3):452-70. doi: 10.1016/j.neuron.2016.03.032.
- Nys M, Kesters D, Ulens C. Structural insights into Cys-loop receptor function and ligand recognition. *Biochem Pharmacol*. 2013 Oct 15;86(8):1042-53. doi: 10.1016/j.bcp.2013.07.001.
- Ohshima T, Ward JM, Huh CG, Longenecker G, Veeranna, Pant HC, Brady RO, Martin LJ, Kulkarni AB. Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 1;93(20):11173-8. doi: 10.1073/pnas.93.20.11173.
- Pareek TK, Keller J, Kesavapany S, Agarwal N, Kuner R, Pant HC, Iadarola MJ, Brady RO, Kulkarni AB. Cyclin-dependent kinase 5 modulates

- nociceptive signaling through direct phosphorylation of transient receptor potential vanilloid 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jan 9;104(2):660-5. doi: 10.1073/pnas.0609916104.
- Pao PC, Tsai LH. Three decades of Cdk5. *J Biomed Sci*. 2021 Nov 23;28(1):79. doi: 10.1186/s12929-021-00774-y.
- Patrick GN, Zhou P, Kwon YT, Howley PM, Tsai LH. p35, the neuronal-specific activator of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*. 1998 Sep 11;273(37):24057-64. doi: 10.1074/jbc.273.37.24057.
- Paucar M, Waldthaler J, Svenningsson P. GLRA1 mutation and long-term follow-up of the first hyperekplexia family. *Neurol Genet*. 2018 Aug 7;4(4):e259. doi: 10.1212/NXG.0000000000000259.
- Peterson DW, Ando DM, Taketa DA, Zhou H, Dahlquist FW, Lew J. No difference in kinetics of tau or histone phosphorylation by CDK5/p25 versus CDK5/p35 in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Feb 16;107(7):2884-9. doi: 10.1073/pnas.0912718107.
- Petrini EM, Barberis A. Diffusion dynamics of synaptic molecules during inhibitory postsynaptic plasticity. *Front Cell Neurosci*. 2014 Sep 23;8:300. doi: 10.3389/fncel.2014.00300.
- Pilorge M, Fassier C, Le Corrionc H, Potey A, Bai J, De Gois S, Delaby E, Assouline B, Guinchat V, Devillard F, Delorme R, Nygren G, Råstam M, Meier JC, Otani S, Cheval H, James VM, Topf M, Dear TN, Gillberg C, Leboyer M, Giros B, Gautron S, Hazan J, Harvey RJ, Legendre P, Betancur C. Genetic and functional analyses demonstrate a role for



- abnormal glycinergic signaling in autism. *Mol Psychiatry*. 2016 Jul;21(7):936-45. doi: 10.1038/mp.2015.139.
- Pollock VV, Pastoor T, Katnik C, Cuevas J, Wecker L. Cyclic AMP-dependent protein kinase A and protein kinase C phosphorylate  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptor subunits at distinct stages of receptor formation and maturation. *Neuroscience*. 2009 Feb 18;158(4):1311-25. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.11.032.
- Qu D, Rashidian J, Mount MP, Aleyasin H, Parsanejad M, Lira A, Haque E, Zhang Y, Callaghan S, Daigle M, Rousseaux MW, Slack RS, Albert PR, Vincent I, Woulfe JM, Park DS. Role of Cdk5-mediated phosphorylation of Prx2 in MPTP toxicity and Parkinson's disease. *Neuron*. 2007 Jul 5;55(1):37-52. doi: 10.1016/j.neuron.2007.05.033.
- Rozas P, Lazcano P, Piña R, Cho A, Terse A, Pertusa M, Madrid R, Gonzalez-Billault C, Kulkarni AB, Utreras E. Targeted overexpression of tumor necrosis factor- $\alpha$  increases cyclin-dependent kinase 5 activity and TRPV1-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  influx in trigeminal neurons. *Pain*. 2016 Jun;157(6):1346-1362. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000527.
- Hisanaga S, Saito T. The regulation of cyclin-dependent kinase 5 activity through the metabolism of p35 or p39 Cdk5 activator. *Neurosignals*. 2003 Sep-Oct;12(4-5):221-9. doi: 10.1159/000074624.
- Salceda R (2022) Glycine neurotransmission: Its role in development. *Front. Neurosci*. 16:947563. doi: 10.3389/fnins.2022.947563
- Saliba RS, Kretschmannova K, Moss SJ. Activity-dependent phosphorylation of GABAA receptors regulates receptor insertion and

- tonic current. *EMBO J.* 2012 Jun 29;31(13):2937-51. doi: 10.1038/emboj.2012.109.
- San Martín VP, Sazo A, Utreras E, Moraga-Cid G and Yévenes GE (2022) Glycine Receptor Subtypes and Their Roles in Nociception and Chronic Pain. *Front. Mol. Neurosci.* 15:848642. doi: 10.3389/fnmol.2022.848642
- Shah K, Lahiri DK. Cdk5 activity in the brain - multiple paths of regulation. *J Cell Sci.* 2014 Jun 1;127(Pt 11):2391-400. doi: 10.1242/jcs.147553.
- Shah, K., & Rossie, S. (2017). Tale of the Good and the Bad Cdk5: Remodeling of the Actin Cytoskeleton in the Brain. *Molecular Neurobiology*, 55(4), 3426–3438. doi:10.1007/s12035-017-0525-3
- Smith PD, Mount MP, Shree R, Callaghan S, Slack RS, Anisman H, Vincent I, Wang X, Mao Z, Park DS. Calpain-regulated p35/cdk5 plays a central role in dopaminergic neuron death through modulation of the transcription factor myocyte enhancer factor 2. *J Neurosci.* 2006 Jan 11;26(2):440-7. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2875-05.2006.
- Specht, C. G., Grünewald, N., Pascual, O., Rostgaard, N., Schwarz, G., and Triller, A. (2011). Regulation of glycine receptor diffusion properties and gephyrin interactions by protein kinase C. *EMBO J.* 30, 3842–3853. doi: 10.1038/emboj.2011.276
- Specht CG, Izeddin I, Rodriguez PC, El Beheiry M, Rostaing P, Darzacq X, Dahan M, Triller A. Quantitative nanoscopy of inhibitory synapses: counting gephyrin molecules and receptor binding sites. *Neuron.* 2013 Jul 24;79(2):308-21. doi: 10.1016/j.neuron.2013.05.013.

- Su SC, Tsai LH. Cyclin-dependent kinases in brain development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011;27:465-91. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154023.
- Sun H, Lu L, Zuo Y, Wang Y, Jiao Y, Zeng WZ, Huang C, Zhu MX, Zamponi GW, Zhou T, Xu TL, Cheng J, Li Y. Kainate receptor activation induces glycine receptor endocytosis through PKC deSUMOylation. *Nat Commun.* 2014 Sep 19;5:4980. doi: 10.1038/ncomms5980.
- Takahashi S, Ohshima T, Cho A, Sreenath T, Iadarola MJ, Pant HC, Kim Y, Nairn AC, Brady RO, Greengard P, Kulkarni AB. Increased activity of cyclin-dependent kinase 5 leads to attenuation of cocaine-mediated dopamine signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Feb 1;102(5):1737-42. doi: 10.1073/pnas.0409456102.
- Talwar, S. and Lynch, J. W. (2014) Phosphorylation mediated structural and functional changes in pentameric ligand-gated ion channels: implications for drug discovery. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 53, 218– 23, doi: 10.1016/j.biocel.2014.05.028
- Tarricone, C., Dhavan, R., Peng, J., Areces, L. B., Tsai, L. H., and Musacchio, A. (2001) Structure and regulation of the CDK5-p25(nck5a) complex. *Mol. Cell* 8, 657– 669, doi: 10.1016/S1097-2765(01)00343-4
- Terunuma M, Xu J, Vithlani M, Sieghart W, Kittler J, Pangalos M, Haydon PG, Coulter DA, Moss SJ. Deficits in phosphorylation of GABA(A) receptors by intimately associated protein kinase C activity underlie

- compromised synaptic inhibition during status epilepticus. *J Neurosci*. 2008 Jan 9;28(2):376-84. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4346-07.2008.
- Timothy I. Webb, & Joseph W. Lynch. (2007). Molecular Pharmacology of the Glycine Receptor Chloride Channel. *Current Pharmaceutical Design*, 13(23), 2350–2367. doi:10.2174/138161207781368693
- Tomizawa K, Ohta J, Matsushita M, Moriwaki A, Li ST, Takei K, Matsui H. Cdk5/p35 regulates neurotransmitter release through phosphorylation and downregulation of P/Q-type voltage-dependent calcium channel activity. *J Neurosci*. 2002 Apr 1;22(7):2590-7. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-07-02590.2002.
- Utreras E, Futatsugi A, Rudrabhatla P, Keller J, Iadarola MJ, Pant HC, Kulkarni AB. Tumor necrosis factor-alpha regulates cyclin-dependent kinase 5 activity during pain signaling through transcriptional activation of p35. *J Biol Chem*. 2009 Jan 23;284(4):2275-84. doi: 10.1074/jbc.M805052200.
- Utreras E, Futatsugi A, Pareek TK, Kulkarni AB. Molecular Roles of Cdk5 in Pain Signaling. *Drug Discov Today Ther Strateg*. 2009 Sep;6(3):105-111. doi: 10.1016/j.ddstr.2009.04.004.
- Vaello ML, Ruiz-Gómez A, Lerma J, Mayor F Jr. Modulation of inhibitory glycine receptors by phosphorylation by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 1994 Jan 21;269(3):2002-8.
- Velázquez-Flores MÁ, Salceda R. Glycine receptor internalization by protein kinases activation. *Synapse*. 2011 Nov;65(11):1231-8. doi: 10.1002/syn.20963.

- Wang J, Liu S, Fu Y, Wang JH, Lu Y. Cdk5 activation induces hippocampal CA1 cell death by directly phosphorylating NMDA receptors. *Nat Neurosci.* 2003 Oct;6(10):1039-47. doi: 10.1038/nn1119.
- Wang RA, Randić M. alpha-subunit of CaM-KII increases glycine currents in acutely isolated rat spinal neurons. *J Neurophysiol.* 1996 Jun;75(6):2651-3. doi: 10.1152/jn.1996.75.6.2651.
- Wang RA, Cheng G, Kolaj M, Randić M. Alpha-subunit of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II enhances gamma-aminobutyric acid and inhibitory synaptic responses of rat neurons in vitro. *J Neurophysiol.* 1995 May;73(5):2099-106. doi: 10.1152/jn.1995.73.5.2099.
- Wang Y. The functional regulation of TRPV1 and its role in pain sensitization. *Neurochem Res.* 2008 Oct;33(10):2008-12. doi: 10.1007/s11064-008-9750-5.
- Wässle H, Heinze L, Ivanova E, Majumdar S, Weiss J, Harvey RJ, Haverkamp S. Glycinergic transmission in the Mammalian retina. *Front Mol Neurosci.* 2009 Jul 9;2:6. doi: 10.3389/neuro.02.006.2009.
- Watanabe E, Akagi H. Distribution patterns of mRNAs encoding glycine receptor channels in the developing rat spinal cord. *Neurosci Res.* 1995 Nov;23(4):377-82. doi: 10.1016/0168-0102(95)00972-V.
- Weltzien F, Puller C, O'Sullivan GA, Paarmann I, Betz H. Distribution of the glycine receptor  $\beta$ -subunit in the mouse CNS as revealed by a novel monoclonal antibody. *J Comp Neurol.* 2012 Dec 1;520(17):3962-81. doi: 10.1002/cne.23139.

- Werman R, Davidoff RA, Aprison MH. Inhibition of motoneurons by iontophoresis of glycine. *Nature*. 1967 May 13;214(5089):681-3. doi: 10.1038/214681a0.
- Westenbroek RE, Hell JW, Warner C, Dubel SJ, Snutch TP, Catterall WA. Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel alpha 1 subunit. *Neuron*. 1992 Dec;9(6):1099-115. doi: 10.1016/0896-6273(92)90069-p.
- Wong AS, Lee RH, Cheung AY, Yeung PK, Chung SK, Cheung ZH, Ip NY. Cdk5-mediated phosphorylation of endophilin B1 is required for induced autophagy in models of Parkinson's disease. *Nat Cell Biol*. 2011 May;13(5):568-79. doi: 10.1038/ncb2217.
- Winkelmann A, Maggio N, Eller J, Caliskan G, Semtner M, Häussler U, Jüttner R, Dugladze T, Smolinsky B, Kowalczyk S, Chronowska E, Schwarz G, Rathjen FG, Rechavi G, Haas CA, Kulik A, Gloveli T, Heinemann U, Meier JC. Changes in neural network homeostasis trigger neuropsychiatric symptoms. *J Clin Invest*. 2014 Feb;124(2):696-711. doi: 10.1172/JCI71472.
- Wiśniewski JR, Nagaraj N, Zougman A, Gnäd F, Mann M. Brain phosphoproteome obtained by a FASP-based method reveals plasma membrane protein topology. *J Proteome Res*. 2010 Jun 4;9(6):3280-9. doi: 10.1021/pr1002214.
- Xia H, Hornby ZD, Malenka RC. An ER retention signal explains differences in surface expression of NMDA and AMPA receptor subunits. *Neuropharmacology*. 2001 Nov;41(6):714-23. doi: 10.1016/s0028-3908(01)00103-4.

- Xing BM, Yang YR, Du JX, Chen HJ, Qi C, Huang ZH, Zhang Y, Wang Y. Cyclin-dependent kinase 5 controls TRPV1 membrane trafficking and the heat sensitivity of nociceptors through KIF13B. *J Neurosci*. 2012 Oct 17;32(42):14709-21. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1634-12.2012.
- Yang YR, He Y, Zhang Y, Li Y, Li Y, Han Y, Zhu H, Wang Y. Activation of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) in primary sensory and dorsal horn neurons by peripheral inflammation contributes to heat hyperalgesia. *Pain*. 2007 Jan;127(1-2):109-20. doi: 10.1016/j.pain.2006.08.008.
- Yevenes GE, Peoples RW, Tapia JC, Parodi J, Soto X, Olate J, Aguayo LG. Modulation of glycine-activated ion channel function by G-protein betagamma subunits. *Nat Neurosci*. 2003 Aug;6(8):819-24. doi: 10.1038/nn1095.
- Yu H, Bai XC, Wang W. Characterization of the subunit composition and structure of adult human glycine receptors. *Neuron*. 2021 Sep 1;109(17):2707-2716.e6. doi: 10.1016/j.neuron.2021.08.019.
- Zeilhofer HU, Acuña MA, Gingras J, Yévenes GE. Glycine receptors and glycine transporters: targets for novel analgesics? *Cell Mol Life Sci*. 2018 Feb;75(3):447-465. doi: 10.1007/s00018-017-2622-x.
- Zhang C, Nobles RD, McCall MA. GlyR $\alpha$ 2, not GlyR $\alpha$ 3, modulates the receptive field surround of OFF retinal ganglion cells. *Vis Neurosci*. 2015;32:E026. doi: 10.1017/S0952523815000280.
- Zhang P, Shao XY, Qi GJ, Chen Q, Bu LL, Chen LJ, Shi J, Ming J, Tian B. Cdk5-Dependent Activation of Neuronal Inflammasomes in Parkinson's Disease. *Mov Disord*. 2016 Mar;31(3):366-76. doi: 10.1002/mds.26488.

Zhang ZY, Bai HH, Guo Z, Li HL, He YT, Duan XL, Suo ZW, Yang X, He YX, Hu XD. mGluR5/ERK signaling regulated the phosphorylation and function of glycine receptor  $\alpha 1$  subunit in spinal dorsal horn of mice. *PLoS Biol.* 2019 Aug 21;17(8):e3000371. doi: 10.1371/journal.pbio.3000371.

Zhang ZY, Guo Z, Li HL, He YT, Duan XL, Suo ZW, Yang X, Hu XD. Ubiquitination and inhibition of glycine receptor by HUWE1 in spinal cord dorsal horn. *Neuropharmacology.* 2019 Apr;148:358-365. doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.02.002.

Zhao S, Ting JT, Atallah HE, Qiu L, Tan J, Gloss B, Augustine GJ, Deisseroth K, Luo M, Graybiel AM, Feng G. Cell type-specific channelrhodopsin-2 transgenic mice for optogenetic dissection of neural circuitry function. *Nat Methods.* 2011 Sep;8(9):745-52. doi: 10.1038/nmeth.1668.