



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

Modulación de la función del Receptor de glicina α_3 por la proteína de andamiaje AKAP79

Tesis para optar al grado de Magíster en Neurobiología

ANGGELO ENRIQUE SAZO AMIGO

CONCEPCIÓN-CHILE

2020

Profesor Guía: Dr. Gonzalo Yévenes Crisóstomo

Profesor co-Guía: Dr. Gustavo Moraga-Cid

Dpto. de Fisiología

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

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

Profesores integrantes del comité evaluador:

Profesor Guía

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

Profesor Co-Guía

Dr. Gustavo Moraga-Cid
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dr. Elías Utreras Puratich
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

Dr. Patricio Castro Maldonado
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Directora(s) Programa:



Dra. Katterine Salazar M.
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Agradecimientos

Quisiera agradecer:

Al proyecto FONDECYT 1140515, que permitió el financiamiento de este trabajo.

A mi Profesor guía y tutor Dr. Gonzalo Yévenes, por todo el apoyo otorgado, la paciencia, dedicación y la disponibilidad para guiarme durante el desarrollo de esta tesis. Además, motivarme siempre a seguir adelante y por contribuir de gran manera a mi formación en el área de la neurociencia.

A mi Profesor Co-guía Dr. Gustavo Moraga-Cid, por el aporte al desarrollo de nuevas metodologías que permitieron desarrollar parte importante de este trabajo, las charlas críticas sobre la elaboración de los experimentos y los resultados obtenidos.

Al Dr. Elías Utreras y al Dr. Patricio Castro, por su excelente disposición para integrar el comité evaluador en varias ocasiones durante el periodo de Magíster, y por darse el tiempo de corregir y evaluar esta tesis.

A Victoria San Martín, Ana María Marileo y Cesar Lara, por la constante colaboración en el desarrollo y crítica de los experimentos. También por ser parte importante en mi desarrollo laboral y personal en la búsqueda de la vocación científica.

Al personal técnico del laboratorio de Neurofisiología: Ixia Cid, David Flaig y Laurie Aguayo.

A toda mi familia en Talca por su entrega, pese a la distancia siempre siento su mano sobre mi hombro, su dedicación en mi crianza, sus palabras de aliento y su inmutable apoyo para ayudarme a lograr mis metas.

A mi pareja lo Giroux Bravo y su familia por abrirme las puertas de su familia en este tiempo en Concepción, además, de su incondicional apoyo en mi crecimiento personal. Innumerables ocasiones de celebración, de contemplación y de pensamientos que perdurarán siempre en mi corazón.

Finalmente agradezco a la vida mi hijo Gabriel, quien me incentiva día a día con un espíritu de lucha, perseverancia y superación. Gracias por tus sonrisas sinceras, tus miradas de asombro al mundo y tu amor, eres el pilar fundamental de mi vida.

Índice de Contenidos

Índice de Tablas	4
Índice de Figuras	4
Abreviaturas	5
Resumen	7
Abstract	8
Introducción	9
Generalidades del receptor de glicina	9
Antecedentes estructurales de los RGli.....	9
Relevancia del DIC en la funcionalidad del RGli.....	10
Rol de la subunidad RGli- α_3 en nocicepción.....	11
Generalidades de las proteínas de anclaje asociadas a quinasa A (<i>A-kinase anchoring proteins</i>).....	13
Rol de AKAP79 en el control nociceptivo:	14
Hipótesis y Objetivos	17
Hipótesis	17
Objetivo general.....	17
Objetivos específicos	17
Metodología.....	18
Plásmidos.	18
Cultivo celular y Transfección.....	18
Inmunohistoquímica.	18
Expresión, purificación y GST <i>Pull-Down</i>	19
Electrofisiología.....	22
Análisis de Datos y Estadísticas.....	23
Resultados.....	24
Estudio de colocalización de AKAP79 con las subunidades alfa del RGli mediante inmunocitoquímica en células HEK293	24
Análisis de la interacción de AKAP79 con el dominio intracelular del RGli- α_3 mediante aproximaciones de " <i>Pull-Down</i> " en células HEK293.....	28
Estudio de propiedades de RGli- α_3 en células HEK293 sobre-expresando AKAP79 mediante técnicas electrofisiológicas	37
Discusión	41

Colocalización de AKAP79 con las subunidades alfa del RGlI en células HEK293.	41
Interacción directa de AKAP79 con el dominio intracelular del RGlI- α_3	42
Estudiar la función de RGlI- α_3 en células HEK293 sobre-expresando AKAP79 mediante técnicas electrofisiológicas.	44
Conclusiones	45
Bibliografía.....	46



Índice de Tablas

Tabla 1. Parámetros cultivo HEK293 sobre-expresando AKAP79-GFP + RGli- α_3	40
---	----

Índice de Figuras

Figura 1. Metodología co-purificación DIC- RGli- α_3 -GST y AKAP79-GFP mediante columna de afinidad de agarosa.....	20
Figura 2. Metodología Co-purificación plásmido Duet DIC- RGli- α_3 -6xHis-GST-Tag + AKAP79-Flag mediante columnas de afinidad agarosa y Ni-NTA.....	21
Figura 3. Estudio de colocalización entre AKAP79-GFP y RGli- α_1 en células HEK293...	25
Figura 4. Estudio de colocalización entre AKAP79-GFP y RGli- α_2 en células HEK293...	26
Figura 5. Estudio de colocalización entre AKAP79-GFP y RGli- α_3 en células HEK293...	27
Figura 6. Expresión de proteínas recombinantes DIC- RGli- α_3 -GST, GFP y AKAP79-GFP	29
Figura 7. Ensayo de interacción entre AKAP79-GFP y DIC- RGli- α_3 -GST.....	31
Figura 8. Expresión Vector Duet DIC- RGli- α_3 -His-GST y AKAP79-Flag.....	33
Figura 9. Tratamiento con DDM 4% cultivos BL21.....	34
Figura 10. Ensayo de co-purificación en columnas de glutatión-agarosa y Ni-NTA.....	36
Figura 11. Curva concentración-respuesta de RGli- α_3 en células HEK293.....	38
Figura 12. Efecto de AKAP79 en la desensibilización de RGli- α_3	39

Abreviaturas

RGLi: Recetor de Glicina.

pLGICs: Canales iónicos activados por ligando pentaméricos.

nAChR: Receptor nicotínico de acetilcolina.

5-HT3: Receptor de serotonina tipo 3.

GABA: ácido γ -aminobutírico

DEC: Dominio extra celular

DIC: Dominio intracelular

DTM: Dominio transmembrana

PKA: Proteína quinasa A

PKC: Proteína quinasa C

PGE2: Prostaglandina E2

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

2,6-DTBP: 2,6-ditert-butilfenol

AKAP: Proteína de anclaje asociada a quinasa

AKAP79: Proteína de anclaje asociada a quinasa A 79

AKAP79-GFP: Proteína fusión AKAP79 y GFP

PPP3: Fosfoproteína fosfatasa 3

PIP2: fosfatidilinositol bisfosfato

PSD-95: Proteína densidad postsináptica 95

SAP97: Proteína asociada a sinapsis 97

NMDA: ácido N-metil-D-aspártico

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

LTP: Potenciación a largo plazo

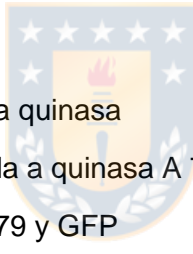
LTD: Depresión a largo plazo

PSD: Densidad postsináptica

GluA1: Receptor de glutamato A1

β 2-AR: Receptor beta 2 adrenérgico

TRPV1: receptor de potencial transitorio vaniloide



DRG: Raíz de los ganglios dorsales

GFP: Proteína fluorescente verde

HEK293: Célula embrionaria humana de riñón 293

PBS: Suero fetal bovino

FNR: Fracción no retenida

DDM: n-Dodecyl-beta D-Maltoside

GST: Glutathion S transferasa

ROI: Región de interés



Resumen

La inhibición glicinérgica es crítica para el control de la respiración, la regulación del tono muscular y la nocicepción. Estudios previos han mostrado que la fosforilación vía PKA en el residuo S346 del dominio intracelular del receptor de glicina alfa 3 (RGli- α_3) produce una disminución en la neurotransmisión glicinérgica en la médula espinal, la cual se relaciona con la generación y mantenimiento de estados asociados a dolor crónico de tipo inflamatorio. Sin embargo, los mecanismos moleculares que controlan la fosforilación del RGli- α_3 aun no son claros. En este contexto, otros investigadores han mostrado que la interacción de la proteína de anclaje asociada a quinasa A (AKAP79) a canales iónicos que participan en el procesamiento del dolor es clave para la regulación de los eventos de fosforilación vía PKA. Por ejemplo, se ha reportado que el bloqueo de la interacción directa entre AKAP79 y TRPV1 disminuyó la sensibilización de neuronas nociceptivas, regulando fosforilación de residuos intracelulares. Por otro lado, se ha descrito la interacción directa entre AKAP79 y las subunidades β_3 y β_2 del receptor GABA_A en residuos ubicados en el dominio intracelular del canal. Pese a su potencial importancia en dolor crónico, la potencial modulación del RGli por AKAP79 aún no ha sido investigada. Utilizando técnicas de inmunocitoquímica y *pull-down*, nuestros resultados sugieren que existe una interacción directa entre AKAP79 y RGli- α_3 . Análisis de imágenes mostraron que AKAP79 colocaliza con todas las subunidades α del RGli. Además, estudios de *pull-down* mostraron que el dominio intracelular de RGli- α_3 (GST-ICD-RGli- α_3) fue capaz de unirse a AKAP79. Finalmente, estudios electrofisiológicos mostraron que la sobreexpresión de AKAP79 no modifico parámetros funcionales básicos del RGli- α_3 . En conjunto, nuestros hallazgos sugieren que AKAP79 podría ser una pieza adicional para la correcta regulación intracelular del RGli- α_3 . Futuros experimentos en sistemas neuronales contribuirán a definir si AKAP79 es determinante para la función y modulación de RGli a nivel sináptico.

Abstract

Glycinergic inhibition is critical for respiratory control, muscle tone regulation, and nociception. Previous studies showed that PKA phosphorylation in the residue S346 located in the intracellular domain of the alpha 3 glycine receptor (RGli- α_3) produces inhibition of glycinergic neurotransmission on the spinal cord, which was related to the generation and maintaining of inflammatory chronic pain states. Noteworthy, the molecular mechanisms that control RGli- α_3 phosphorylation are still unclear. In this context, other researchers have shown that the interaction of the A-kinase anchoring protein (AKAP79) to ion channels involved in nociceptive pathways is critical for PKA phosphorylation events. Specifically, it has been observed that blocking of the direct interaction between AKAP79 and TRPV1 decreases sensitization in nociceptive neurons, regulating phosphorylation of intracellular residues. Furthermore, the direct interaction between AKAP79 and the β_3 and β_2 subunits of GABA_A receptor at specific residues in the intracellular domain has been described. Despite its potential importance in chronic pain the potential modulation of RGli by AKAP79 has not yet been investigated. Here, by using immunocytochemical and pull-down assays, our results suggest to the direct interaction between AKAP79 and RGli- α_3 . Confocal imaging showed that AKAP79 specifically co-localized with all the RGli subunits. In addition, in pull-down studies we observed that a GST-ICD-RGli- α_3 are able to bind AKAP79. Finally, electrophysiological studies showed that AKAP79 overexpression did not modify basic functional parameters of RGli- α_3 . Thus, our experimental data suggest that AKAP79 could be an additional piece for the correct intracellular regulation of the RGli- α_3 . Future experiments in neural systems will help to define whether AKAP79 is a determinant for the function and modulation of RGli at the synaptic level.

Introducción

Generalidades del receptor de glicina

El normal funcionamiento del sistema nervioso central depende del balance entre la neurotransmisión de neuronas excitatorias e inhibitorias. La sinapsis glicinérgica media la neurotransmisión inhibitoria mayormente en médula espinal y tronco encefálico, donde está asociado al control motor, ritmo respiratorio y está involucrado en procesos sensoriales, incluidas la visión y la audición (Legendre, 2001).

El RGli pertenece a la superfamilia de canales iónicos activados por ligando pentaméricos (pLGICs, por sus siglas en inglés) junto a los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), el receptor de serotonina tipo 3 (5-HT₃) y los receptores de GABA_A (Gielen & Corringer, 2018). Anteriormente conocidos como la familia Cys-Loop, estos receptores forman complejos pentaméricos transmembranas que forman un poro central el cual se abre transitoriamente con la unión de su ligando, permitiendo el flujo de iones a favor de un gradiente electroquímico (Lynagh & Lynch, 2010). El aminoácido glicina es el agonista principal de los RGli (Lynch et al., 2017). En neuronas maduras de la médula espinal, la unión de glicina al RGli genera su apertura resultando en el influjo de iones Cl⁻ a través del poro del canal hiperpolarizando la membrana postsináptica e inhibiendo de ese modo la excitabilidad neuronal (Lynch, 2009).

La disfunción del RGli o de la transmisión glicinérgica se ha relacionado directamente con desórdenes neurológicos como la hiperekplexia (Zhang *et al.*, 2016), epilepsia (Carvajal-González *et al.*, 2014) y dolor crónico de tipo inflamatorio (Yevenes & Zeilhofer, 2011). Recientes estudios han demostrado que moléculas con actividad moduladora de RGli tiene actividad analgésica (Bregman et al., 2016; Xiong et al., 2012 Zhang & Wang, 2015;), sugiriendo que la modulación farmacológica de RGli podría ser un emergente blanco terapéutico para tratar fenómenos de dolor crónico (Cioffi, 2017; Yevenes & Zeilhofer, 2011).

Antecedentes estructurales de los RGli

Se han descrito hasta la fecha, 4 subunidades α (α 1-4) y una subunidad β . Las subunidades α poseen un alto grado de homología en sus secuencias, sin embargo, poseen también importantes diferencias en sus propiedades biofísicas y farmacológicas como también en sus patrones espacio temporales de expresión (Lynch, 2009).

La estructura del canal iónico se encuentra formada por 5 subunidades ensambladas alrededor de un poro central presente en la membrana plasmática (Nys *et al.*, 2013; Prevost *et al.*, 2013). Los RGLi pueden existir como homopentámeros conteniendo solo subunidades α o como heteropentámeros compuestos por las subunidades α o β (Langosch, Thomas & Betz, 1988). La estequiometría del canal originalmente se pensaba que era $3\alpha:2\beta$ (Burzomato *et al.*, 2003), pero en el último tiempo se revisó y reportó la conformación $2\alpha:3\beta$ (Yang *et al.*, 2012).

En los últimos años se han resuelto estructuras en alta resolución para los RGLi, las cuales han otorgado importante información acerca de sitios de unión en el receptor, incluyendo estudios de criomicroscopía electrónica en RGLi- α_1 de pez cebra unido a estricnina, glicina e ivermectina (Du *et al.*, 2015). Por otro lado, se encuentra disponible las estructuras cristalinas del RGLi- α_3 unido a estricnina (Huang *et al.*, 2015) y a un nuevo potenciador de RGLi que tiene actividad analgésica (Huang *et al.*, 2017).

Estructuralmente, cada subunidad posee un dominio extracelular (DEC) con sitios de unión para agonistas y antagonistas (Yevenes & Zeilhofer, 2011). Además, un dominio transmembrana (DTM) donde se ha determinado que el TM2 es esencial para la formación del poro permeable a cloruro (Shan *et al.*, 2011). Finalmente, un dominio intracelular (DIC) formado por un loop entre los TM3 y TM4 el cual ha cobrado relevancia funcional y estructural en los últimos años (Lynch, 2004; Baenziger and Corringer, 2011)

Relevancia del DIC en la funcionalidad del RGLi.

En los últimos años la relevancia funcional del DIC en la modulación del RGLi ha cobrado un particular interés. Por ejemplo, las estructuras resueltas mencionadas antes fueron solamente posible cuando se reemplazó el DIC por un péptido más corto (Huang *et al.*, 2015). Además, se ha descrito la interacción del DIC de la subunidad β con la proteína de anclaje Gefirina, la cual confiere la estabilidad al receptor en la densidad postsináptica (Grünwald *et al.*, 2018). El DIC es también la única región de los RGLi que posee sitios de fosforilación reconocidos (Lynch, 2004; Harvey *et al.*, 2004, Langlhofer & Villmann, 2016; Moraga-Cid *et al.*, 2020). Dichas fosforilaciones pueden provocar una variedad de efectos, desde alteraciones en el nivel de expresión en la superficie celular hasta cambios en la conductancia del canal (Velázquez-Flores & Salceda, 2011; Moraga-Cid *et al.*, 2020). Un reciente estudio demuestra que, usando mutantes fosfomiméticas la

activación de vías señalización por PKA disminuyen la conductancia de RGLi- α_3 en registros de *single-channel* (Moraga-Cid *et al.*, 2020).

Además, el DIC sufre modificaciones post-traduccionales uniendo factores que permiten la modulación de las propiedades funcionales del canal (Langlhofer & Villmann, 2016). Algunos ejemplos son modulación por la proteína $G_{\beta\gamma}$ (Yevenes *et al.*, 2008), endocannabinoides (Yévenes & Zeilhofer, 2011), fosforilación por PKC y PKA (Acuña *et al.*, 2016; Breitinger *et al.*, 2018), ubiquitinación (Zhang *et al.*, 2019) y unión de sec8 (Winkelmann *et al.*, 2014). Estos reportes evidencian que el DIC pasó de ser considerado un loop accesorio sin una función reconocida o estudiada a una zona con una notoria relevancia para la funcionalidad del RGLi.

Rol de la subunidad RGLi- α_3 en nocicepción.

La transmisión de señales asociadas a nocicepción está vinculada a áreas dorsales de la médula espinal (Kandel, 1986). Nociceptores localizados en la piel, tejidos profundos o vísceras transmiten la información a neuronas nociceptivas en láminas profundas de la médula espinal (Zeilhofer *et al.*, 2012). Además, las láminas superficiales de la asta dorsal de la médula espinal han mostrado abundante inhibición sináptica glicinérgica (Chery & de Koninck, 1999).

Se ha observado que la subunidad RGLi- α_1 y RGLi- α_3 se expresan principalmente en la lámina I y II de la asta dorsal de la médula espinal (Harvey *et al.*, 2004). Combinaciones de experimentos de electrofisiología y comportamiento han demostrado que el dolor crónico inflamatorio se asocia a una disminución de la función inhibitoria de RGLi que contienen la α_3 expresados la asta dorsal de la médula espinal (Harvey *et al.*, 2004; Bonin & De Koninck, 2013). Evidencia desde diferentes grupos de investigación han permitido establecer el mecanismo mediante el cual se produce la disfunción de RGLi α_3 . Estudios electrofisiológicos identificaron que PGE₂ es la prostaglandina predominante en la médula espinal (Zeilhofer *et al.*, 2005). La activación de los receptores de prostaglandina E2 genera una reducción en la amplitud de las corrientes sinápticas glicinérgicas (Harvey *et al.*, 2004; Zeilhofer *et al.* 2012). Estos receptores activan la proteína G_{α_s} la cual promueve la acción corriente abajo de la proteína adenilato ciclasa, aumentando los niveles de AMPc (Harvey *et al.*, 2004). Este importante segundo mensajero activa a PKA la cual ejercerá su función enzimática sobre sus blancos moleculares, entre ellos la fosforilación del residuo serina 346 del RGLi- α_3 . Esta fosforilación disminuye la función glicinérgica de neuronas

de la lámina II (Acuña et al., 2016; Harvey et al., 2004). Estudios más recientes han demostrado que una ablación de interneuronas glicinérgicas en la asta dorsal de la médula espinal de ratones afecta la transmisión de estímulos nociceptivos y los animales desarrollan hiperalgesia y malestar espontáneo (Foster et al., 2015).

Por otra parte, estudios farmacológicos han sugerido que la alteración funcional de RGli- α_3 provocada por la fosforilación podría ser controlada farmacológicamente de manera específica (Acuña et al., 2016; Bregman et al., 2016). Un ejemplo de este concepto es el compuesto no anestésico derivado del Propofol, 2,6-ditert-butilfenol (2,6-DTBP), el cual potencia RGli homoméricos y carece de actividad sobre R-GABA_A (Ahrens et al., 2004). Curiosamente, este compuesto no potencia el receptor heteromérico RGli- $\alpha_3\beta$ a menos que este haya sido fosforilado (Acuña et al., 2016), lo que sugiere un nivel de asociación importante entre los mecanismos de acción de la droga y los involucrados en la fosforilación. Como modelo teórico, este estudio sugirió que el receptor sufre cambios estructurales inducidos por la fosforilación en el DIC, el cual podría mejorar la unión de la droga. En modelos animales de dolor crónico inflamatorio, 2,6-DTBP produjo analgesia RGli- α_3 dependiente (Acuña et al., 2016).

En conjunto, estos resultados muestran que procesos de fosforilación gatillados por mediadores inflamatorios generan una disfunción en RGli- α_3 expresados en láminas superficiales de la médula espinal. La disminución de las corrientes asociadas a la activación del RGli- α_3 reduce el control inhibitorio de las proyecciones nociceptivas aumentando la transmisión nociceptiva hacia áreas superiores. A pesar de su relevancia, la comprensión a nivel molecular, biofísico y celular del proceso de fosforilación de RGli- α_3 no están completamente dilucidados. En este contexto, estudios muy recientes de nuestro grupo han determinado que la fosforilación disminuye la conductancia de canal iónico, lo que explicaría la disminución las corrientes sinápticas de manera directa. Sin embargo, la participación de otras proteínas o factores que regulen el proceso de fosforilación de RGli- α_3 aún esperan por ser explorados.

Generalidades de las proteínas de anclaje asociadas a quinasa A (*A-kinase anchoring proteins*)

Las proteínas de anclaje asociadas a quinasa A (AKAP) son proteínas que participan en proveer un ambiente molecular capaz de coordinar al menos otras dos proteínas en una sola unidad funcional (Sanderson & Dell'Acqua, 2011). Éstas son una extensa familia de proteínas de anclaje con particulares funciones, siendo el punto común la capacidad de unir a PKA (Sanderson & Dell'Acqua, 2011). Se ha caracterizado el sitio de unión de la subunidad RI o RII de PKA al dominio C-terminal de AKAP79 (Li et al., 2012). Esta unión flexible entre AKAP y el dominio RII de PKA permite que ésta adopte diferentes conformaciones, a través de las cuales puede buscar sustratos para fosforilar incluso en condiciones basales de la actividad quinasa de PKA (Smith et al., 2017).

Se ha postulado que las AKAP no poseen actividad enzimática intrínseca, pero sí poseen un efecto modulador en cascadas de señalización vía PKA (Boehm et al., 2006). Las AKAP a través de estas coordinaciones forman complejos de señalización estables que permiten aumentar la eficiencia de interacciones proteicas (Hirst et al., 2011). A menudo las AKAP se encuentran interaccionando con receptores de membrana (por ejemplo, canales iónicos) (Welch et al., 2010), adenilil ciclasas (Ritter & Hall, 2009), quinasas (PKA o PKC, por ejemplo) o algunas fosfatasa (PPP3) (Welch et al., 2010).

Estudios previos han descrito la funcionalidad de las AKAP en diferentes sistemas siendo AKAP79/150 (sigla por su peso molecular en los ortólogos humano/murino respectivamente) una de las AKAP más estudiadas (Guo et al., 2015; Purkey & Dell'Acqua, 2020; Zhang et al., 2019). Para motivos de este trabajo se referirá a AKAP79/150 como su ortólogo humano AKAP79. Ésta se encuentra ampliamente expresada en sistema nervioso central, permitiendo el anclaje de proteínas con un amplio espectro de funciones biológicas en diferentes subtipos neuronales (Zhang et al., 2016).

Funcionalmente, AKAP79 se encuentra anclada a la membrana a través de interacciones electroestáticas de 3 dominios polibásicos de su estructura con PIP₂, cadherinas y F-actina cortical (Gomez et al., 2002; Dell'Acqua et al., 2002; Gorski et al., 2005). Además, AKAP79, puede unir otras proteínas de anclaje como PSD-95 y SAP97 (Colledge et al., 2000; Robertson et al., 2009). Esta interacción permite el ensamblaje "scaffold-scaffold", generando un complejo que permite un dominio cercano de proteínas quinasas y

fosfatasa en la proximidad de un gran número de sustratos, incluyendo receptores postsinápticos y canales iónicos (Zhang et al., 2016).

Estudios bioquímicos y electrofisiológicos han demostrado la participación de AKAP79 en diversos procesos de plasticidad neuronal, como por ejemplo los procesos de *long-term potentiation* y *long-term depression* en hipocampo (Lu et al., 2008). Estos procesos de plasticidad neuronal influyen de manera directa los cambios del número de receptores expresados en la densidad postsináptica (PSD) y sus propiedades biofísicas, las cuales pueden ser moduladas por procesos de fosforilación y desfosforilación (Malenka & Bear, 2004). Se ha observado que en hipocampo la modulación de la plasticidad sináptica involucra a receptores de glutamato ionotrópicos, incluyendo receptores de NMDA y AMPA (Lu et al., 2008). Estudios funcionales han logrado observar la importancia de AKAP79 en la regulación de plasticidad sináptica vía PKA y CaN en receptores AMPA y NMDA a través de experimentos utilizando una AKAP79 mutante deficiente del sitio de unión a PKA (AKAP79- Δ PKA) (Sanderson et al., 2016). Esta modificación en la estructura de AKAP79 genera una disminución en la fosforilación del residuo S845 de GluA1 del 40%-45% en neuronas hipocámpales (Sanderson et al., 2016). En estados fisiológicos, PKA fosforila a GluA1 en el residuo Ser-845, lo cual promueve el tráfico directo de GluA1 a la membrana plasmática para estimular la inserción sináptica y mejorar la probabilidad de apertura del canal (Yang et al., 2010). Estos resultados están en línea al modelo de ciclos localizados de fosforilación y desfosforilación confinados a un pequeño set de GluA1 para mayor impacto en la función sináptica (Guire et al., 2008). En resumen, AKAP79 cumple un importante rol de modulación en procesos de LTP y LTD dependientes de PKA en receptores AMPA expresados en hipocampo (Purkey & Dell'Acqua, 2020).

En conjunto, estos resultados muestran el rol que posee AKAP79 en sistemas sinápticos y la modulación que ejerce en proteínas de sus micro-dominios funcionales. Sin embargo, a la fecha **no se ha descrito la participación de las AKAP como moduladores de la función sináptica en la médula espinal** (Fischer & McNaughton, 2014).

Rol de AKAP79 en el control nociceptivo:

Una característica de la manifestación de dolor crónico es la sensibilización neuronal de largo tiempo, la cuál es producida por una amplificación irregular de las vías nociceptivas (Kuner & Flor, 2016). Una amplia variedad de canales iónicos es modificada en estos procesos, muchos de los cuales son regulados por complejos de señalización

asociados a AKAP79 (Fischer et al., 2013). Un ejemplo de interacción es la relación de AKAP79 con el receptor β_2 adrenérgico (β_2 -AR). AKAP79 recluta a PKA y PKC a las cercanías de β_2 -AR regulando la fosforilación del receptor después de la estimulación por agonista modulando la señalización corriente abajo a través de la ruta MAP quinasa (Fraser et al., 2000). Estas evidencias pueden hacer a la interacción β_2 -AR/AKAP79/PKA un blanco para tratamientos analgésicos. Posiblemente una aplicación de agonistas de β_2 -AR podrían aliviar la sensibilización de vías nociceptivas las cuales contribuyen a dolor crónico de tipo neuropático (Yalcin et al., 2010).

Por otra parte, la asociación del canal iónico TRPV1 con AKAP79 modula procesos de sensibilización mediados por PKA. TRPV1 es un canal iónico permeable a calcio que responde a estímulos químicos (por ejemplo; Capsaicina, componente que otorga sensación de picor del ají) y a estímulos térmicos ($>42^\circ\text{C}$) (Caterina et al., 2000). TRPV1 es ampliamente expresado en neuronas de la raíz de los ganglios dorsales (DRG) de la médula espinal (Bevan et al., 2014). Además, estudios han demostrado que este canal es esencial para el desarrollo de hiperalgesia térmica inflamatoria (Davis et al., 2000). Estudios de microscopía de super resolución han demostrado la estrecha colocalización entre TRPV1 y AKAP79 en neuronas sensoriales (Zhang et al., 2016). Además, se observó una disminución significativa en la latencia a estímulos térmicos luego de la administración de capsaicina en ratones *knock-out* para AKAP79 comparado con ratones *wild type* (Por et al., 2010). Asimismo, estudios bioquímicos e inmunitoquímicos demostraron que la inhibición con bloqueadores de la interacción entre TRPV1 y AKAP79 disminuye el porcentaje de sensibilización de TRPV1 ante acción de agonista capsaicina en cultivos de neuronas sensoriales de ratón (Zhang et al., 2008). Por otro lado, se observó que la delección genética de la interacción AKAP79-PKA en ratones atenuó la hiperalgesia térmica mediada por PGE_2 (Schnizler et al., 2008). Además, se observó el mismo efecto al inyectar un péptido (St-Ht31) que interfiere en la interacción AKAP79-PKA en ratones D36 disminuyendo la hiperalgesia térmica (Schnizler et al., 2008).

Adicionalmente, se ha descrito que AKAP79 interacciona con otros receptores de la familia del TRPV1. Experimentos bioquímicos mostraron que AKAP79 anclando PKA y PKC, facilita la fosforilación y sensibilización de TRPA1 bajo estimulación de mGluR5 en neuronas aferentes primarias contribuyendo al proceso de dolor crónico (Brackley et al., 2017). Así también, se ha descrito la interacción directa entre el canal iónico TRPV4 y AKAP79, en donde se describe la modulación de la función del canal vía AKAP79 (Mack

& Fischer, 2017). En conjunto, estas evidencias demuestran la modulación y participación de AKAP79 en vías nociceptivas coordinando complejos de señalización que se presentan como potenciales blancos terapéuticos para dolor crónico.

Sin embargo, a la fecha existe solo un reporte que relacione a AKAP79 y receptores inhibitorios asociados al control del dolor. En específico, el trabajo de Brandon y colaboradores describen la interacción de AKAP79 y la subunidad β_1 y β_3 de receptores GABA_A (Brandon *et al.*, 2003). En este trabajo se detalla por una parte que PKA fosforila residuos del DIC de la subunidad GABA_A- β_3 . Además, se detalla en experimentos de GST-*Pull down* que existe interacción directa entre la subunidad GABA_A- β_1 y GABA_A- β_3 y AKAP79 formando un complejo GABA_A- β_3 /AKAP79/PKA (Brandon *et al.*, 2003). Además, los autores señalan mediante experimentos de co-inmunoprecipitación que este complejo es posible encontrarlo en neuronas de ratones (Brandon *et al.*, 2003). A esto se suman experimentos de inmunocitoquímica que detallan la distribución subcelular de receptores GABA_A en neuronas hipocampales. En estos se describe una alta inmunoreactividad en el soma y procesos neuronales consistentes con estudios previos (Colledge *et al.*, 2000). Análisis de conteo de puntas arrojaron que existe una íntima asociación entre AKAP79 y la subunidad GABA_A- β_1 y GABA_A- β_3 en neuronas hipocampales (Brandon *et al.*, 2003).

Sin embargo, la potencial interacción entre AKAP79 y los RGLi aún permanece inexplorada. Dado que: 1. Existe una inhibición en la función de RGLi- α_3 mediada por fosforilación vía PKA y 2. AKAP79 es relevante para la función de PKA y esta interacción es relevante en procesos de modulación de procesos nociceptivos, nuestra pregunta de investigación propone iniciar estudios que determinen si AKAP79 participa en procesos de fosforilación de RGLi- α_3 . Desde este modo, la hipótesis y objetivos de estudio (descritos en la siguiente sección del manuscrito) pretenden caracterizar la potencial interacción entre AKAP79 y RGLi- α_3 utilizando modelos *in vitro*.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

La proteína AKAP79 modula la función del RGlI- α_3 mediante interacción directa con el dominio intracelular.

Objetivo general

Evaluar la interacción y potencial modulación de AKAP79 sobre RGlI- α_3 a través de técnicas bioquímicas, inmunocitoquímicas y electrofisiológicas.

Objetivos específicos

1. Estudiar la co-localización de AKAP79-GFP con RGlI- α_3 mediante inmunocitoquímica en células HEK293.
2. Analizar la interacción de AKAP79-GFP con el dominio intracelular del RGlI- α_3 mediante "GST-Pull-Down" en celular HEK293.
3. Estudiar los efectos de la sobre-expresión de AKAP79-GFP sobre la función de RGlI- α_3 en células HEK293 mediante técnicas electrofisiológicas.



Metodología

Plásmidos.

Los plásmidos utilizados en este proyecto fueron los siguientes (gen/vector): GFP/pGreenLatern, RGli- α_3 WT/pcDNA3 (Harvey *et al.*, 2004),), RGli- α_1 -His-Tag (c-term) /pcDNA3, RGli- α_2 -His-Tag (c-term) /pcDNA3, RGli- α_3 -His-Tag (c-term) /pcDNA3, DIC-RGli- α_3 -GST-Tag, DIC-RGli- α_3 -6xHis-Flag-GST-Tag, AKAP79/150- Δ PKA, AKAP79/150-GFP (Oliveira *et al.*, 2007).

Cultivo celular y Transfección.

Se utilizaron células HEK293 (Human Embryonic Kidney), las que fueron cultivadas y transfectadas según protocolos previamente descritos (Lara *et al.*, 2016). La transfección fue realizada con Lipofectamina 2000 (Invitrogen). El reactivo se agregó en una proporción de 1,5 μ l por cada 1 μ g de DNA para los RGli a transfectar en 100 μ L de Opti-MEM® I (1x) (Invitrogen). Esta mezcla fue agregada directamente sobre las células, las cuales fueron estudiadas después de 18 a 24 horas post-transfección.

Inmunohistoquímica.

Células las HEK293 previamente transfectadas fueron incubadas en cámara húmeda bajo medio de cultivo como se ha descrito previamente (San Martín *et al.*, 2019). Las células fueron lavadas 3 veces con PBS e incubadas con el anticuerpo primario contra 6xHis, ratón (Clontech) en una dilución 1:400 suplementado con suero de caballo 10% en PBS, durante 10-15 minutos a 37°C y 5%CO₂. Posteriormente, las células fueron lavadas 3 veces por 2 minutos con medio de cultivo para ser finalmente fijadas con PFA 4% durante 15 minutos a 4°C. Las células se lavaron 3 veces con PBS 1X durante 3 minutos cada uno y bloqueadas con suero de caballo 10% durante 5 minutos. Se realizará la incubación (en cámara húmeda y en oscuridad) del anticuerpo secundario Cy3 anti ratón (Jackson Immuno Research Laboratories, USA) en una dilución 1:200 en suero de caballo 10% en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente posterior a tres lavados con PBS 1X durante 3 minutos cada uno. Luego se montó las muestras con medio de montaje (Fluorescence 17 Mounting Medium, Dako Cytomation Dako, USA). Las muestras fueron analizadas en un microscopio confocal espectral modelo Zeiss LSM70 (Centro de Microscopia Avanzada, CMA, UdeC). Las imágenes fueron captadas en 2 canales (rojo y verde) y se analizaron planos de 1 μ m en el eje z de cada célula.

Expresión, purificación y GST Pull-Down.

Se realizó el protocolo estandarizado (Guzman *et al.*, 2009) con las consideraciones necesarias para este proyecto. Células HEK293 fueron transfectadas para expresar la proteína AKAP79-GFP y GFP (control negativo). Éstas fueron sonicadas en buffer de lisis (buffer fosfato, 1% Triton X-100, mezcla de inhibidores de proteasas II; Calbiochem, San Diego, CA). Además, Cultivos bacterianos BL21 fueron transformados y cultivados para obtener la proteína DIC-RGli- α_3 -6xHis-GST-Tag. Estas fueron purificadas usando resina de glutatión (Novagen, Madison, WI) y resina de Ni-NTA (Thermo Scientific, Thermo). Cada pellet fue observado mediante geles de acrilamida con tinción azul de comassie y/o western-blot usando anticuerpos respectivos, anti 6xHis (NeuroMab clone N144/14, anti mouse) y anti GFP (NeuroMab clone N86/38, anti mouse) para AKAP79-GFP. Para el estudio de interacción se generó la metodología mostrada en la figura 1, donde el sobrenadante purificado del DIC- RGli- α_3 -GST se incubó por al menos 4 h en agitación a 4°C en resina de glutatión-agarosa. Se capturó la fase no retenida (FNR) y posteriormente se lavó la columna con buffer de lavado. Luego se incubó en la columna el lisado HEK293 expresando AKAP79-GFP en agitación a 4°C por al menos 4 h. Se capturó la FNR y se generaron dos lavados con buffer de lavado. Finalmente se generaron fracciones de elución de 1 ml y se visualizaron todas las fases del proceso mediante geles de acrilamida al 10% en tinción Azul de Comassie y western-blot anti GFP.

Además, se utilizó el plásmido Duet/ DIC-RGli- α_3 -6xHis-GST-Tag + AKAP79-Flag, el cual codifica ambas proteínas. Los cultivos fueron lisados en buffer de lisis y centrifugados. La fracción del precipitado fue incubada por al menos 6 horas en agitación con n-Dodecyl-beta D-Maltoside (DDM) al 4%. El producto resultante fue centrifugado por 2 h a 13.000 rpm. Y purificado mediante columnas de glutatión-agarosa y Ni-NTA. Cada proteína previamente purificada (DIC-RGli- α_3 -6xHis-GST-Tag) se co-incubó con los sobrenadantes de AKAP79-GFP y GFP por 4 h en agitación a 4°C como se muestra en a figura 2. Las fracciones de cada parte del protocolo fueron detectadas en geles de acrilamida en tinción Azul de Comassie y/o western blots.

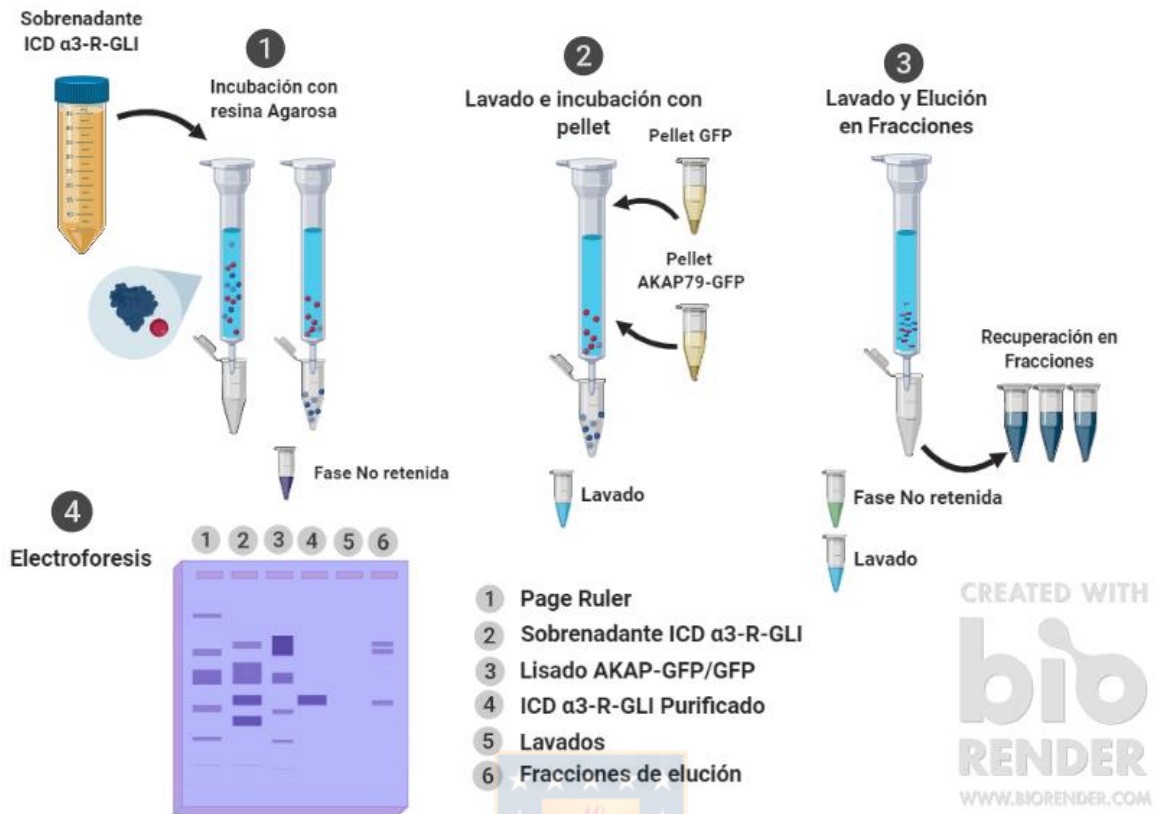


Figura 1. Metodología co-purificación DIC- RGLI- α ₃-GST y AKAP79-GFP mediante columna de afinidad de agarosa.

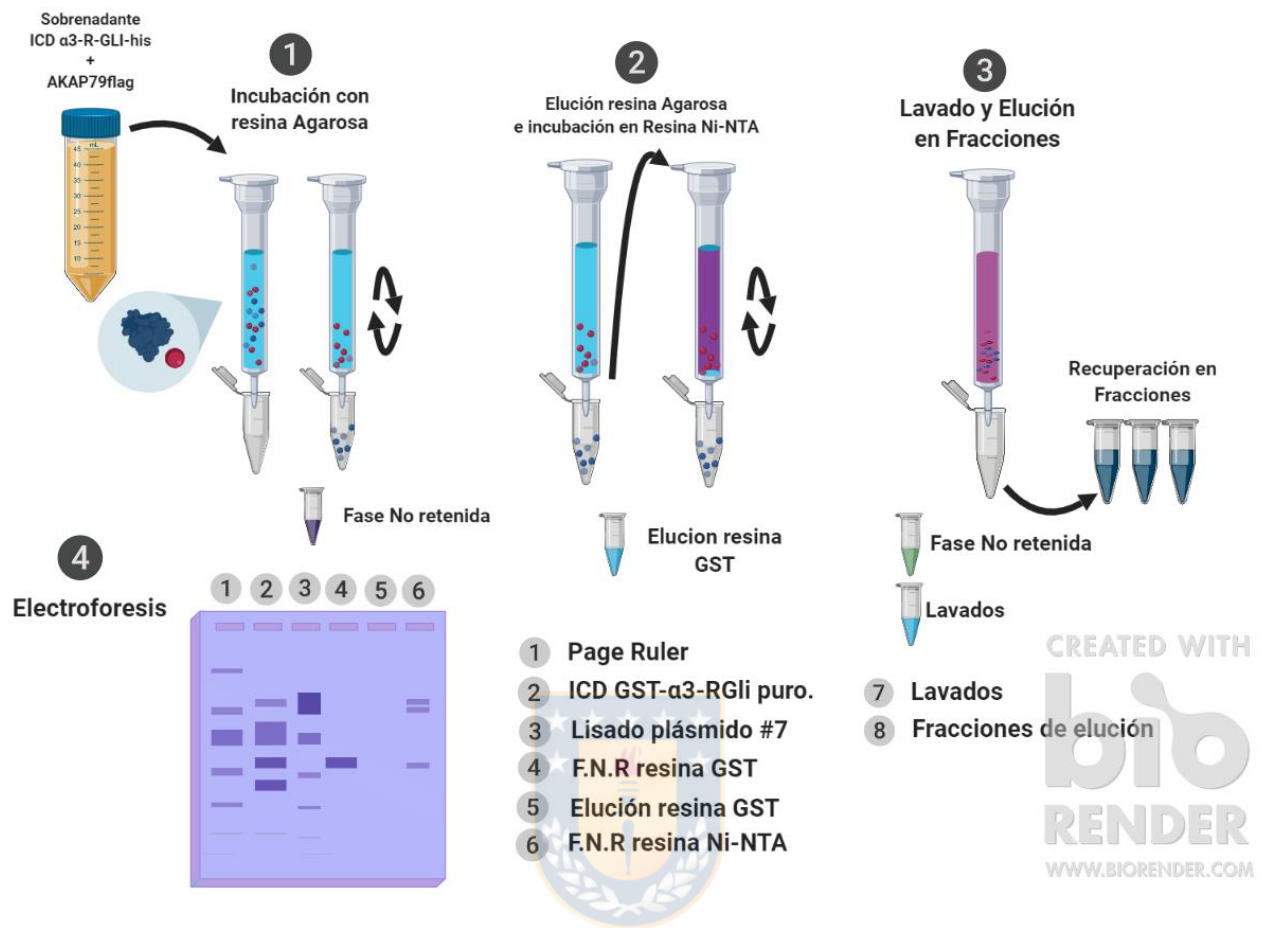


Figura 2. Metodología Co-purificación plásmido Duet DIC-RGli- α_3 -6xHis-GST-Tag + AKAP79-Flag mediante columnas de afinidad agarosa y Ni-NTA.

Electrofisiología.

Soluciones: Solución externa: 150mM NaCl, KCl 5.4mM, CaCl₂ 2mM, MgCl₂ 1mM, glucosa 10mM, HEPES 10mM. La solución fue ajustada a pH 7,4 y a una osmolaridad entre 320-330 mOsm, almacenándose a 4°C hasta el momento de utilización. Solución interna: CsCl 120mM, MgCl₂ 2mM, ATP-Na₂ 2mM, BAPTA 10 mM, GTP 0.5 mM y HEPES 10 mM. Esta solución se ajustó a pH 7,35 – 7,4 y 290-310 mOsm almacenándose a -20 °C. La solución “stock” de glicina 10mM fue preparada utilizando Glicina hidrocloreuro (Sigma). Las pipetas registro fueron construidas con capilares de borosilicato (WPI, Sarasota, FL) con el uso de un puller horizontal (Sutter Instruments P- 89, Novato, CA) y una microforja (MF-830, Narishige Japan) para obtener pipetas de resistencia 3-5 MΩ para el modo célula completa.

Registros Electrofisiológicos: Los registros electrofisiológicos fueron realizados en modo célula completa (Whole-cell). Se incorporó solución interna a la micropipeta y esta fue conectada al electrodo de registro. Utilizando un microscopio invertido (Diaphot, Nikon, Japan) acoplado a una unidad de fluorescencia, las células positivamente transfectadas se identificaron mediante la emisión de fluorescencia por la expresión de GFP utilizando filtros para FITC en el microscopio. Los registros fueron realizados sobre condiciones AKAP79-GFP + RGli-α₃ y la de control negativo RGli-α₃ + GFP.

El potencial de membrana fue fijado a -60 mV y la corriente se filtró a 2kHz. Se aplicó el agonista Glicina mediante una línea de perfusión doble, la cual fue ubicada aproximadamente a 50μm de la célula. La concentración de glicina (2000μM) (San Martín *et al.*, 2019) fue aplicada durante 3 segundos para realizar los registros de corriente evocada. Las corrientes evocadas por glicina fueron registradas con un amplificador EPC10 (HEKA Electronics, Alemania) y los datos obtenidos se guardaron utilizando un computador conectado al sistema y el programa computacional Patchmaster (HEKA Electronics, Alemania).

Las curvas concentración-respuesta se construyeron a partir de las amplitudes de las corrientes evocadas por glicina utilizando la ecuación.

$$I_{gli} = I_{max} [gli]^{nh} / ([gli]^{nh} + [EC_{50}]^{nh})$$

Donde ***I_{max}***, corresponde a la corriente máxima obtenida en presencia del agonista glicina y ***nh*** corresponde al número de Hill, valor que da cuenta del número de sitios promedio al cual el agonista puede acceder.

Además, los parámetros (EC_{50} y los coeficientes de Hill, nH) fueron obtenidos de la ecuación descrita anteriormente.

Finalmente se evaluaron cambios en las corrientes máximas de RGLI- α_3 en presencia o ausencia de AKAP79-GFP (cambio en el porcentaje de corriente máxima desensibilizada y el tiempo de decaimiento) mediante registros de célula completa aplicando concentraciones saturantes de agonista durante 3 segundos.

Análisis de Datos y Estadísticas.

Para estudios de inmunocitoquímica las comparaciones estadísticas (San Martín *et al.*, 2019) fueron realizadas con ANOVA, en los cuales un $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. El análisis de co-localización fue realizado a través del análisis *off-line* de las imágenes de inmunocitoquímica obtenidas mediante microscopía confocal usando el programa FIJI. Se deconvolucionó las imágenes cuando fue necesario para el análisis de los canales.

Para el objetivo n°2, la interacción AKAP79 y DIC-RGLI- α_3 fue considerada positiva cuando se observó señal asociada a cada fracción de elución en las condiciones correspondientes.

Las corrientes evocadas fueron cuantificadas con el software de análisis electrofisiológico ClampFit 9.0 (Axon Instruments). Para realizar los análisis estadísticos y gráficos resumen se utilizó el programa Origin 6.0 (Microcal, USA) donde los valores $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos mediante test t-Student. Además, en los gráficos los valores expuestos fueron expresarán como el promedio \pm error estándar.

Resultados

Estudio de colocación de AKAP79 con las subunidades alfa del RGlI mediante inmunocitoquímica en células HEK293

Para observar la co-expresión de AKAP79 y las subunidades alfa del RGlI, se co-transfectó la proteína AKAP79-GFP con cada subunidad alfa del RGlI para luego ser sometidas a protocolos de inmunocitoquímica.

Es posible observar en la figura 3 que la señal asociada a AKAP79-GFP fue significativamente mayor en parámetros de colocación como Pearson (0.087 ± 0.419) y M1 (0.469 ± 0.284) en comparación a su control GFP cuando se transfectaba con RGlI- α_1 .

Así mismo, es posible observar en la figura 4 que la señal asociada a AKAP79-GFP fue significativamente mayor en parámetros de colocación como Pearson (0.446 ± 0.321), M1 (0.619 ± 0.246) y M2 (0.649 ± 0.203) en comparación a su control GFP cuando se transfectaba con RGlI- α_2 .

De igual manera, es posible observar en la figura 5 que la señal asociada a AKAP79-GFP fue significativamente mayor en parámetros de colocación como Pearson (0.533 ± 0.43197), M1 (0.704 ± 0.282) y M2 (0.788 ± 0.156) en comparación a su control GFP cuando se transfectaba con RGlI- α_3 .

De esta forma los índices analizados (Pearson, M1 y M2) muestran un alto grado de colocación entre la proteína AKAP79-GFP y las subunidades alfa del RGlI. Esto sugiere una potencial interacción entre ambas proteínas.

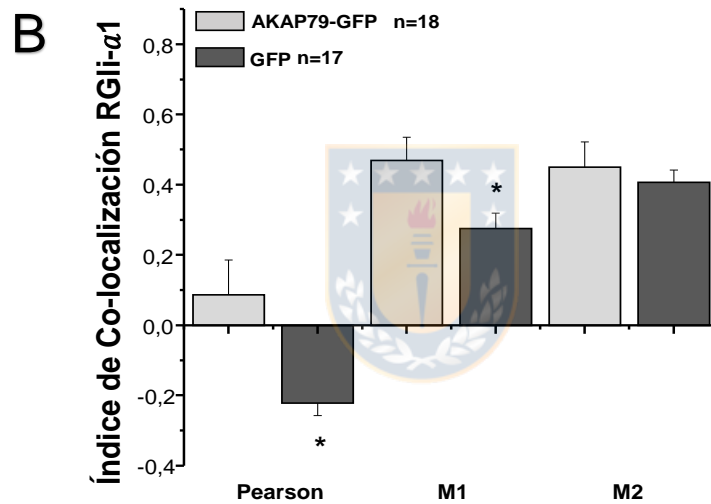
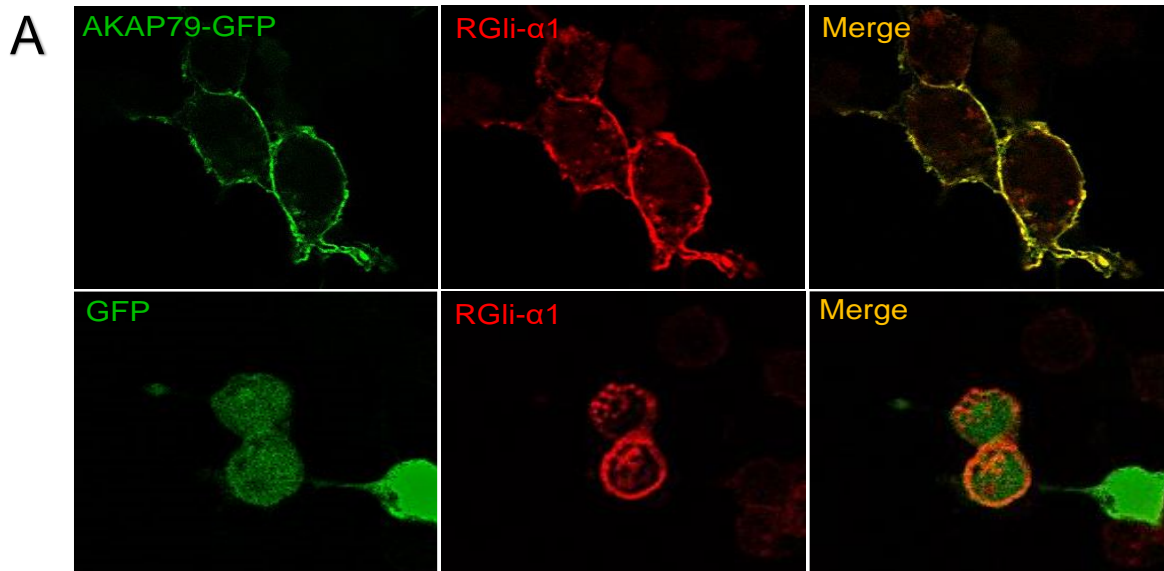


Figura 3. Estudio de colocalización entre AKAP79-GFP y RGLI- α_1 en células HEK293. **A)** Expresión de AKAP79-GFP (verde), RGLI- α_1 (rojo) y la superposición de ambos canales (Merge, amarillo). Expresión de GFP (verde) como control de co-localización, RGLI- α_1 (rojo) y la superposición de ambos canales (Merge, amarillo). **B)** Cuantificación de índice de co-localización basado en parámetros de Pearson y Manders (M1 y M2). Se observan diferencias significativas en los índices de colocalización para Pearson y M1 entre AKAP79-GFP y RGLI- α_1 respecto de su control de co-localización GFP. (*, t-Student, $p < 0.05$). (*, t-Student, $p < 0.05$).

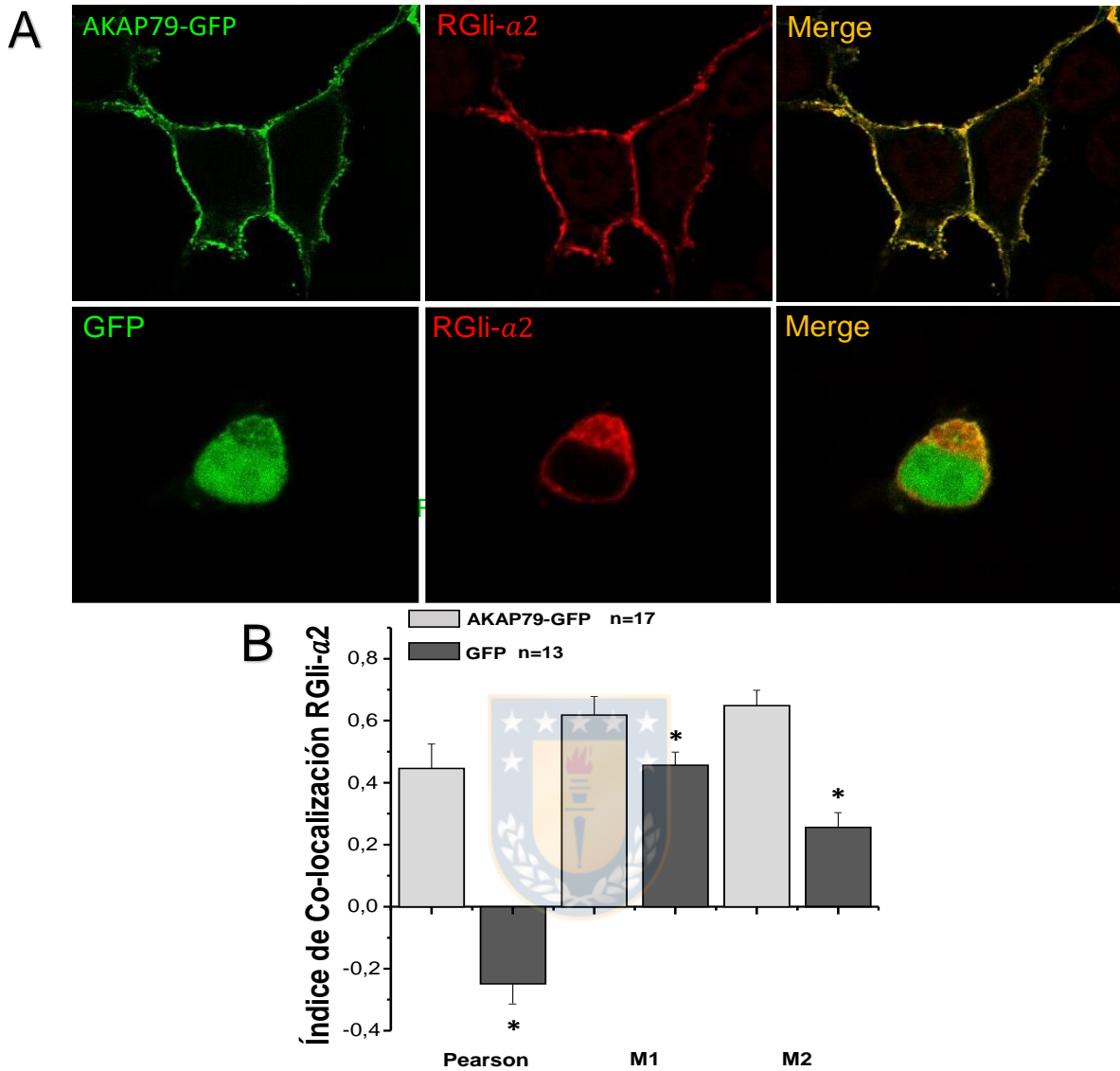


Figura 4. Estudio de colocalización entre AKAP79-GFP y RGLI- α_2 en células HEK293. **A)** Expresión de AKAP79-GFP (verde), RGLI- α_2 (rojo) y la superposición de ambos canales (Merge, amarillo). Expresión de GFP (verde) como control de co-localización, RGLI- α_2 (rojo) y la superposición de ambos canales (Merge, amarillo). **B)** Cuantificación de índice de co-localización basado en parámetros de Pearson y Manders (M1 y M2). Se observan diferencias significativas en los índices de colocalización para Pearson y M1 entre AKAP79-GFP y RGLI- α_2 respecto de su control de co-localización GFP. (*, t-Student, $p < 0.05$).

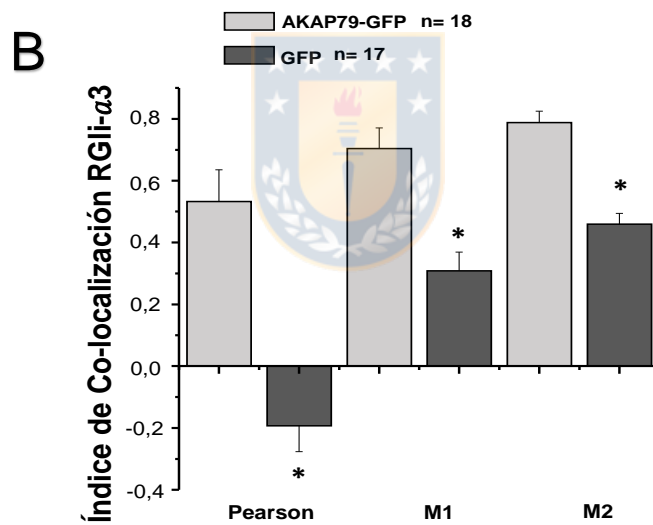
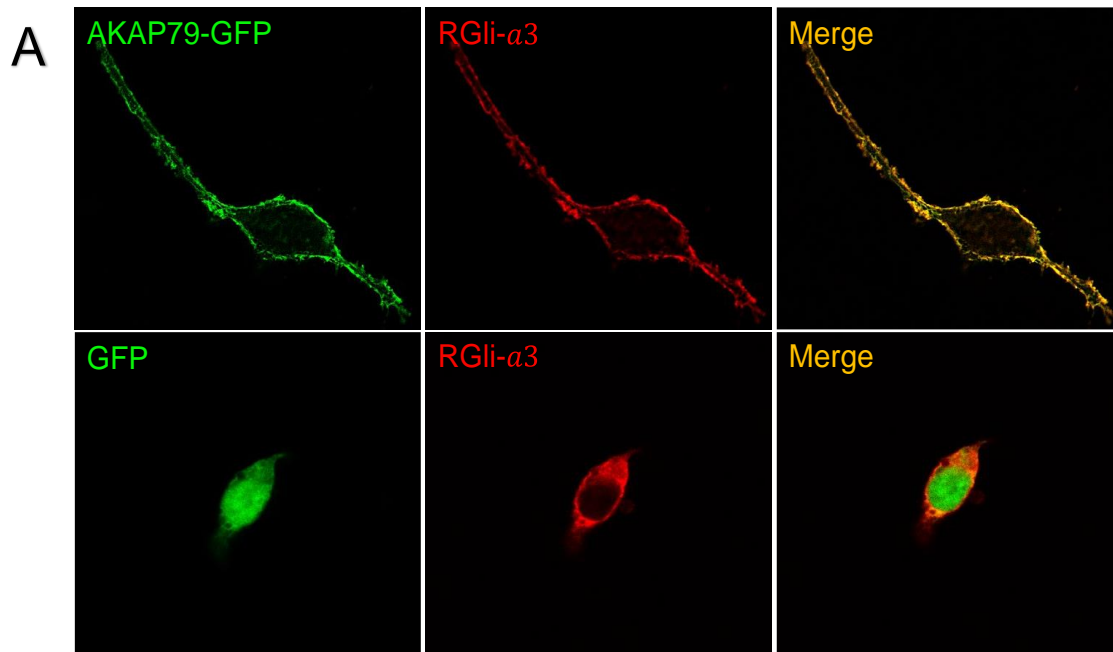


Figura 5. Estudio de colocalización entre AKAP79-GFP y RGLI- α_3 en células HEK293. **A)** Expresión de AKAP79-GFP (verde), RGLI- α_3 (rojo) y la superposición de ambos canales (Merge, amarillo). Expresión de GFP (verde) como control de co-localización, RGLI- α_3 (rojo) y la superposición de ambos canales (Merge, amarillo). **B)** Cuantificación de índice de co-localización basado en parámetros de Pearson y Manders (M1 y M2). Se observan diferencias significativas en los índices de colocalización para Pearson y M1 entre AKAP79-GFP y RGLI- α_3 respecto de su control de co-localización GFP. (*, t-Student, $p < 0.05$).

Análisis de la interacción de AKAP79 con el dominio intracelular del RGlI- α_3 mediante aproximaciones de “Pull-Down” en células HEK293

Para estudiar la potencial interacción directa entre ambas proteínas se realizaron ensayos de interacción entre la proteína de fusión AKAP79-GFP y el DIC del RGlI- α_3 fusionado a GST (DIC- RGlI- α_3 -GST). Para ello, primero se expresó la proteína de fusión AKAP79-GFP en células HEK293. Además, se expresó la proteína GFP para ser utilizada como control negativo de interacción. Los cultivos fueron lisados y posteriormente visualizados mediante geles SDS y western blot revelados con anticuerpos anti GFP para detectar ambas proteínas. En la figura 6A (carril 2 y 3) se observa que en geles SDS la banda asociada al peso molecular de AKAP79-GFP (~107kDa) no es distinguible del resto de lisado celular. Así mismo en la figura 6A (carril 5 y 5) GFP no fue significativamente distinguible del resto del lisado celular.

Posteriormente se decidió observar la expresión de las proteínas mediante western blot usando anticuerpos anti GFP. En la figura 6B (carril 3 y 4) se observa señal asociada a AKAP79-GFP (~107kDa) mediante western blot usando anticuerpos anti GFP. Sin embargo, no se es posible detectar señal asociada a cultivos donde solo se transfectó GFP (~26kDa) (carril 2). Esto indica que AKAP79-GFP es capaz de expresarse en células HEK293.

Por otra parte, cultivos bacterianos BL21 fueron transformados con un plásmido que codifica para el dominio intracelular de RGlI- α_3 (DIC-RGlI- α_3 -GST). Los cultivos fueron lisados y purificados mediante columnas de afinidad de glutatión agarosa. En la figura 6C se observan las diferentes fases de purificación. En el carril 2, se observa un input de lisado total BL21 con una banda cercana a los ~37kDa sugiriendo ser la expresión de DIC-RGlI- α_3 -GST. En el carril 3, se observa una banda cercana a ~37kDa correspondiente a DIC-RGlI- α_3 -GST previamente obtenido y purificado. En el carril 4 y 5 correspondiente a los lavados de la columna se observa que en el peso cercano a ~37kDa no se aprecia una banda prominente lo que sugiere que DIC-RGlI- α_3 -GST está siendo retenida en la columna. Finalmente, en los carriles 6-10 se aprecian las fracciones de elución donde se observa una banda cercana a ~ 37kDa sugiriendo que DIC-RGlI- α_3 -GST es recuperada de la columna.

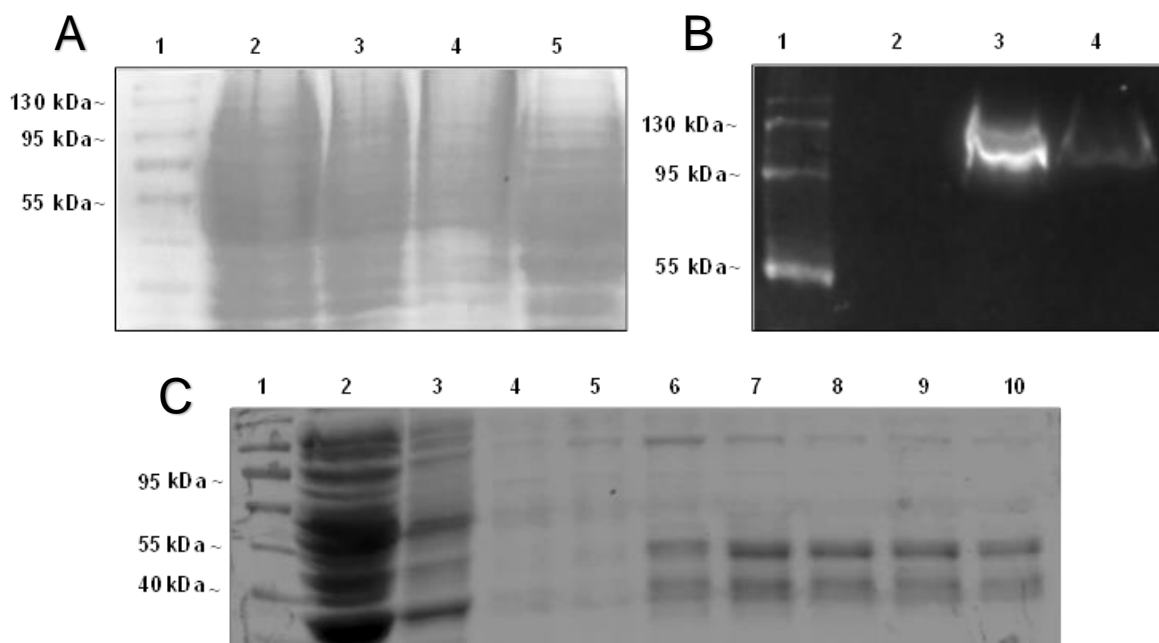


Figura 6. Expresión de proteínas recombinantes DIC- RGli- α_3 -GST, GFP y AKAP79-GFP. A) Gel de acrilamida en tinción azul de comassie con lisado HEK293 con sobreexpresión de AKAP79-GFP y GFP. (1) Page Ruler, (2-3) Input lisado HEK293 sobreexpresando AKAP79-GFP, (4-5) Input lisado HEK293 expresando GFP. **B)** Western-blot anti GFP (1:2000) lisado HEK293 con sobreexpresión de AKAP79-GFP y GFP. (1) Page Ruler, (2) Input lisado HEK293 expresando GFP, (3-4) Input lisado HEK293 sobreexpresando AKAP79-GFP. **C)** Fracciones de purificación DIC- RGli- α_3 -GST mediante columna de glutatión-agarosa en gel de acrilamida en tinción azul de comassie. (1) Page Ruler, (2) Input lisado DIC- RGli- α_3 -GST (3) Fracción No Retenida (FNR), (4-5) Lavados, (6-10) Fracciones de Elución.

Luego, las proteínas recombinantes fueron sometidas a ensayos de “*pull-down*”. En la Figura 7A se observa un gel SDS de las diferentes fases de interacción. En el carril 2 y 3 se observan los inputs de lisados para AKAP79-GFP y DIC-RGli- α_3 -GST respectivamente donde no es posible diferenciar bandas en los pesos moleculares esperados a ambas proteínas (AKAP79-GFP= ~107kDa, DIC-RGli- α_3 -GST= ~37kDa). En el carril 4 se muestra un input de y DIC-RGli- α_3 -GST previamente purificado con una notoria banda en los ~37kDa. Las fracciones de elución del ensayo se observan en el carril 5 y 6 donde se observan en ambos casos una banda en los ~37kDa correspondiente al peso molecular esperado de DIC-RGli- α_3 -GST, sin embargo, no es posible observar bandas cercanas a los ~107kDa correspondientes a AKAP79-GFP. Posteriormente se observaron todas las fases del ensayo incluyendo lavados y todas las fases de elución. En la figura 7B se observa el ensayo completo con todas sus fases donde es posible observar que en los carriles desde 4 a 10 se observa una banda cercana a ~37kDa correspondiente al peso molecular esperado de DIC-RGli- α_3 -GST, sin embargo, no es posible observar bandas cercanas a los ~107kDa correspondientes a AKAP79-GFP.

Para mejorar la detección de AKAP79-GFP se decidió observar mediante western blot usando anticuerpos anti GFP las diferentes fases del ensayo de interacción. En la figura 7C el carril 7 muestra una fracción de elución con una señal cercana a los ~107kDa lo que indica que AKAP79-GFP es retenida en la columna. Además, se observó señal en las fracciones no retenidas pre elución (carril 8) indicando que una parte de la cantidad de proteína no fue retenida. En la figura 7D, se observa que la fase de lavado (carril 2) contiene AKAP79-GFP sugiriendo que una parte del total cargado en el ensayo no es retenida en la columna. Sin embargo, en las fracciones de elución (carril 3) es posible detectar señal positiva para AKAP79-GFP.

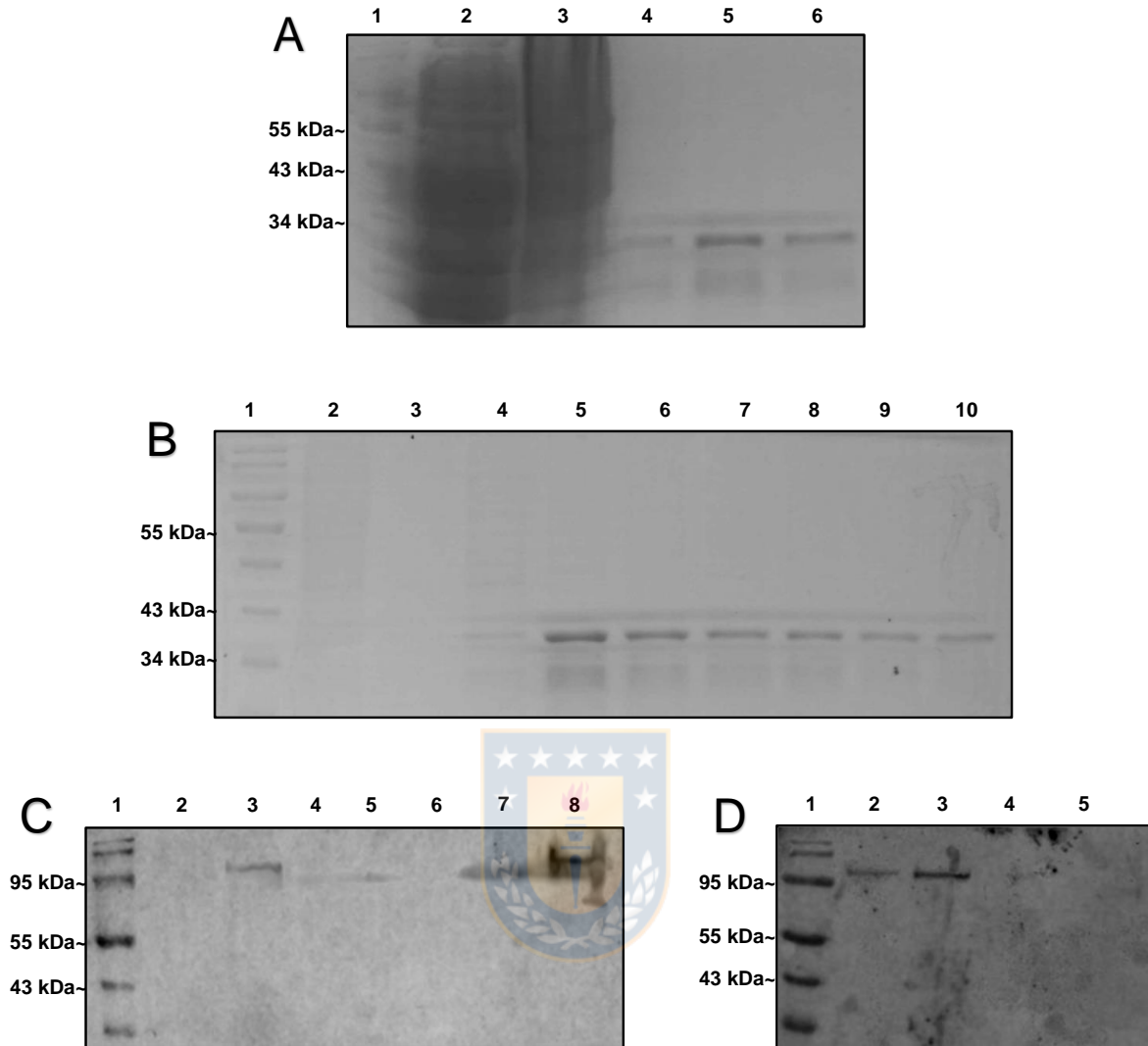


Figura 7. Ensayo de interacción entre AKAP79-GFP y DIC- RGli- α_3 -GST. **A)** Gel de acrilamida 10% en tinción azul de comassie interacción “pull-down”. (1) Page ruler, (2) Input lisado HEK293 sobre-expresando AKAP79-GFP, (3) Input Lisado cultivo BL21 DIC-RGli- α_3 -GST, (4) Input purificado DIC-RGli- α_3 -GST, (5) 2° Fracción de elución “pull-down”, (6) 3° Fracción de elución “pull-down”. **B)** Gel de acrilamida 10% en tinción azul de comassie interacción “pull-down”. (1) Page Ruler, (2-3) 1° y 2° Lavado, (4-10) Fracciones de Elución. **C)** Western-blot anti GFP (1:2000) de interacción “pull-down”. (1) Page Ruler, (2) Input DIC- α_3 GlyR-GST, (3) Input AKAP79-GFP, (4) Input DIC-RGli- α_3 -GST Purificado, (5-6) 2° y 3° Fracción de elución, (7) 1° Lavado, (8) FNR pre-elución. **D)** Western-blot anti GFP (1:2000) de interacción “pull-down”. (1) Page Ruler, (2) 2° Lavado, (3-5) Fracciones de Elución.

En conjunto estos resultados indican que una parte del total de AKAP79-GFP está siendo retenida en columnas previamente cargadas con DIC-RGli- α_3 -GST, sugiriendo una interacción directa entre ambas proteínas. Sin embargo, la falta de controles negativos hace que estos resultados no sean comprobados metodológicamente.

Para mejorar la expresión de las proteínas se trabajó con un vector bacteriano IRES bicistrónico que contienen el gen que codifica para las proteínas DIC-RGli- α_3 -His-GST y AKAP79-Flag. La expresión de ambas proteínas fue observada mediante geles de acrilamida 10% en tinción azul de comassie y western-blot usando anticuerpos anti-Flag para AKAP79-Flag y anti-His6x para DIC-RGli- α_3 -His-GST.

En la figura 8A (carriles 3-10), se observa un gel de acrilamida con alícuotas de lisado total BL21 expresando el vector que codifica ambas proteínas. Aquí es posible observar un patrón de bandeo en los pesos moleculares de ~37kDa para DIC-RGli- α_3 -His-GST y de ~79kDa para AKAP-Flag. Posteriormente para comprobar si este patrón de bandeo correspondía a las proteínas de interés, se hicieron western-blot usando anticuerpos anti Flag para AKAP79-Flag y anti His6x para DIC-RGli- α_3 -His-GST. En la figura 8B se observa un western blot usando anticuerpo anti Flag para inputs de lisado total de cultivos BL21 (carriles 2-9) en donde no es posible observar una señal clara cercana a los ~79kDa correspondiente a AKAP79-Flag. De la misma manera, en la figura 8C se observa un western blot usando anticuerpos anti His6x para inputs de lisado total de cultivos BL21 (carriles 2-9) en donde se observa señal clara cercana a los ~37kDa en todos los carriles correspondiente a DIC-RGli- α_3 -His-GST. Estos resultados en conjunto, indican que existe expresión de DIC-RGli- α_3 -His-GST en cultivos BL21 sin embargo no se logró detectar claramente expresión de AKAP79-Flag.

Posteriormente se lisaron los cultivos BL21 transformados con el detergente DDM (n-Dodecyl-beta D-Maltoside) en una concentración al 4% para optimizar el buffer de lisis previamente usado. La figura 9A muestra un gel de electroforesis en donde es posible observar que el tratamiento con DDM4% aumentó la detección de la señal asociada a DIC-RGli- α_3 -His-GST (carril 3) en relación a la lisis sin DDM4% (carril 2). Sin embargo, no es posible detectar señal asociada a AKAP79-Flag (~79 kDa). Por otra parte, en la figura 9B se muestra un western blot usando anticuerpos anti His6x donde es posible detectar señal positiva en ambos tratamientos.

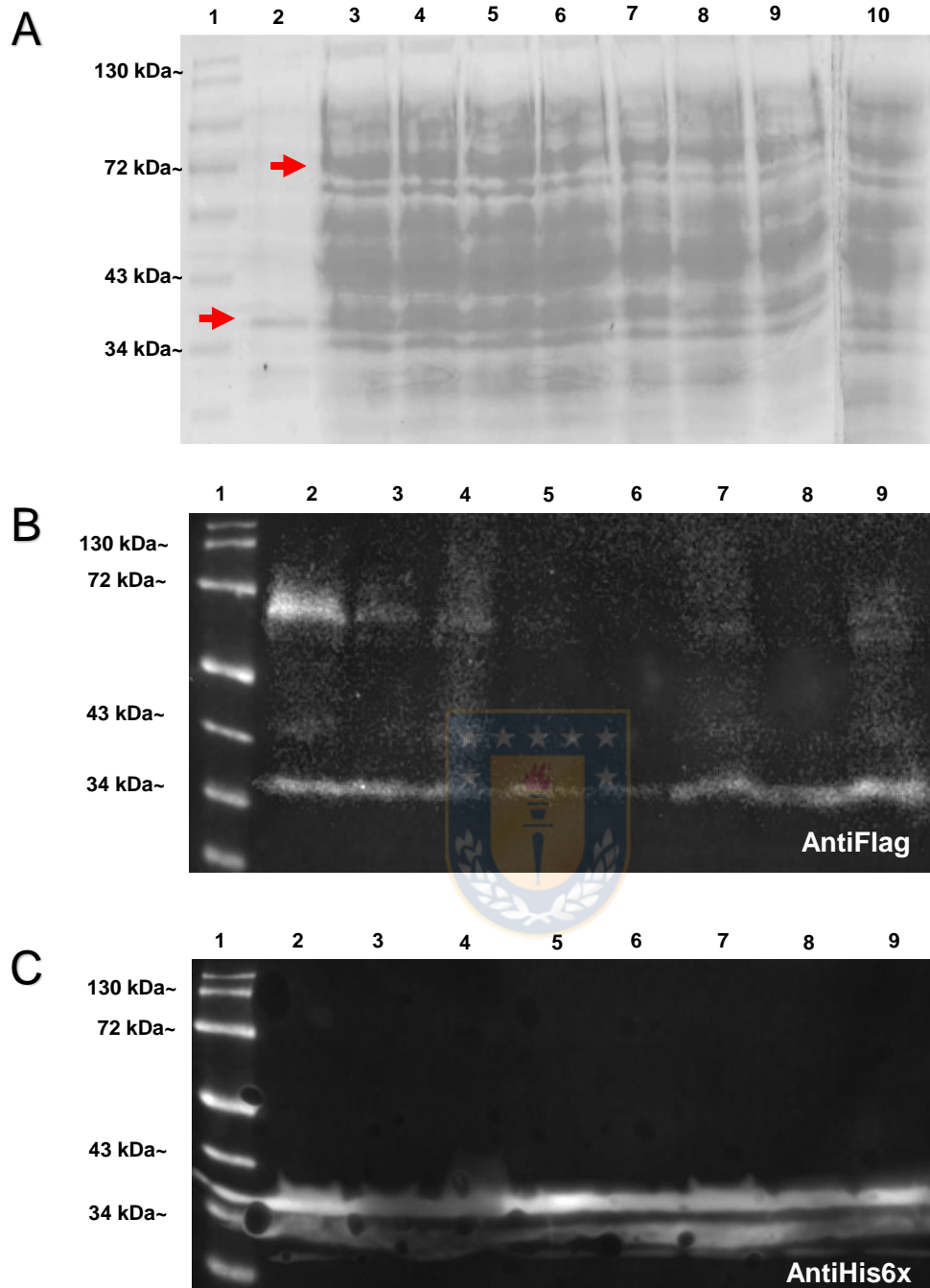


Figura 8. Expresión Vector Duet DIC-RGli- α_3 -His-GST y AKAP79-Flag. **A)** Gel de acrilamida 10% en tinción azul de comassie Vector Duet. (1) Page ruler, (2) DIC- α_3 GlyR-GST purificado, (3-10) Input lisado vector duet, flechas rojas indican pesos moleculares esperados para proteínas DIC-RGli- α_3 -His-GST y AKAP79-Flag. **B)** Western-blot anti-Flag (1:1000) (1) Page rule, (2-9) Input lisado vector duet. **C)** Western-blot anti-His6x (1:2000) (1) Page rule, (2-9) Input lisado vector duet.

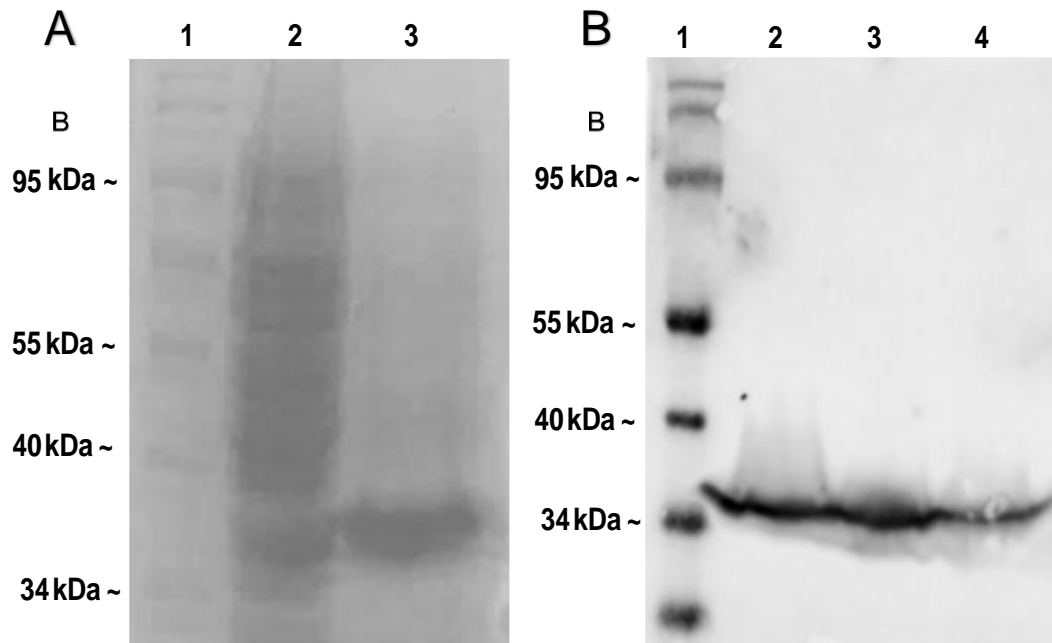
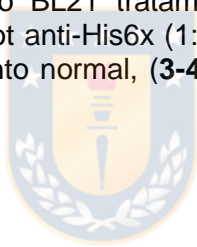


Figura 9. Tratamiento con DDM 4% cultivos BL21. **A)** Electroforesis tratamiento DDM 4%. (1) Page ruler, (2) Input lisado BL21 tratamiento normal, (3) Input lisado BL21 tratamiento DDM 4%. **B)** Western-blot anti-His6x (1:2000) tratamiento DDM 4%. (1) Page ruler, (2) Input lisado BL21 tratamiento normal, (3-4) Input lisado BL21 tratamiento DDM 4%.



Ante estos resultados, se continuó con el procedimiento de co-purificación para las proteínas obtenidas, mediante el protocolo descrito previamente. Como no fue posible detectar la proteína AKAP79-Flag en los resultados anteriores, se modificó el protocolo para incorporar las proteínas obtenidas previamente en cultivos HEK293 (AKAP79-GFP). Los lisados obtenidos luego del tratamiento con DDM 4% fueron puestos primero en una columna de glutatión-agarosa y posteriormente se añadieron los lisados de HEK293 sobrexpresando AKAP79-GFP y GFP. Las fracciones de elución del paso previo fueron introducidas a una segunda columna de Ni-NTA.

La figura 10A muestra un western blot usando anticuerpos anti His6x para el resultado de la elución de la primera columna de glutatión-agarosa en donde se observa que se detecta señal en la fase no retenida para AKAP79-GFP (carril 3) indicando una fracción que no se retiene en la columna. Además, se observa señal en la fase de lavado para AKAP79-GFP (carril 5) indicando que parte de la proteína retenida en la columna se desprende al lavado. Finalmente, se observa señal en la fase de elución para AKAP79-GFP (carril 7) indicando que la proteína está siendo retenida en la columna de glutatión agarosa tratada con DIC-RGli- α_3 -His-GST.

De igual manera, la figura 10B muestra un western blot usando anticuerpos anti His6x para el resultado de la elución de la segunda columna de Ni-NTA. Los resultados muestran que se observa señal en la fase no retenida para AKAP79-GFP (carril 3). Además, se observa señal en la fase de lavado para AKAP79-GFP (carril 5). Finalmente, se observa señal en la fase de elución para AKAP79-GFP (carril 7) indicando que la proteína está siendo retenida en la columna de Ni-NTA tratada con DIC-RGli- α_3 -His-GST.

En ambos casos no es posible observar señal para la proteína GFP a modo de control de interacción en ninguna de las fases del protocolo.

Finalmente, la figura 10C corresponde a un western blot usando anticuerpos anti His6x en donde se observa señal en todas las fases del protocolo. Indicando que en la fracción de elución (carril 7 y 8) la proteína fue retenida durante el tratamiento de ambas columnas.

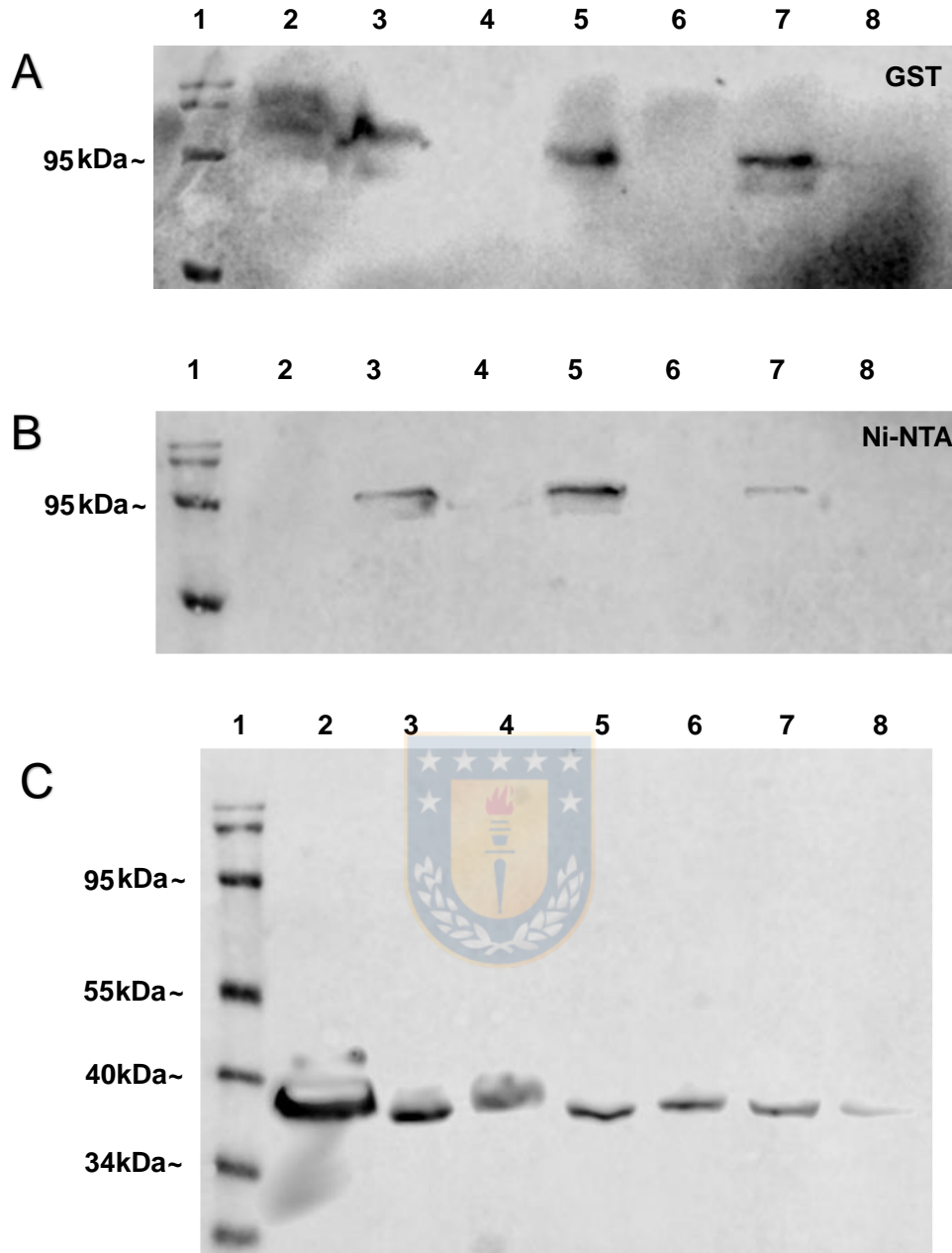


Figura 10. Ensayo de co-purificación en columnas de glutatión-agarosa y Ni-NTA.
A) Western-blot anti GFP (1:2000) por columna de glutatión-agarosa (1) Page ruler, (2) FNR DIC-RGli- α_3 -His-GST, (3) FNR AKAP79-GFP, (4) FNR GFP, (5) Lavado AKAP79-GFP, (6). Lavado GFP, (7) Elución AKAP79-GFP, (8) Elución GFP. **B)** Western-blot anti GFP (1:2000) por columna de Ni-NTA (1) Page ruler, (2) FNR DIC-RGli- α_3 -His-GST, (3) FNR AKAP79-GFP, (4) FNR GFP, (5) Lavado AKAP79-GFP, (6). Lavado GFP, (7) Elución AKAP79-GFP, (8) Elución GFP. **C)** Western-blot anti-His6x (1:2000) fases purificación columna Ni-NTA. (1) Page ruler, (2) FNR DIC-RGli- α_3 -His-GST, (3) FNR AKAP79-GFP, (4) FNR GFP, (5) Lavado AKAP79-GFP, (6). Lavado GFP, (7) Elución AKAP79-GFP, (8) Elución GFP.

Estudio de propiedades de RGl α_3 en células HEK293 sobre-expresando AKAP79 mediante técnicas electrofisiológicas

Para estudiar la posible modulación de RGl α_3 por AKAP79, se realizaron experimentos de *patch clamp* en modalidad célula completa en cultivos de células HEK293 co-transfectadas con RGl α_3 y AKAP79-GFP o GFP. Se realizaron registros de las corrientes glicinérgicas evocadas por glicina en distintas concentraciones (3-2000) para generar curvas concentración respuesta y evaluar diferentes parámetros en ambas condiciones (Figura 11).

De análisis estadísticos de la figura 11 podemos observar que no existen diferencias significativas para las curvas concentración respuesta entre células co-expresando RGl α_3 y AKAP79 versus su control.

Además, se compararon parámetros como el EC₅₀ en ambas condiciones resultando en un EC₅₀: 210.79 \pm 78.24 vs 242.10 \pm 19.19 μ M para control GFP y AKAP79-GFP respectivamente. Se calculó el promedio de corrientes máximas en ambas condiciones resultando en I_{max}_{GFP}: 2334 \pm 603 pA para la condición control y en I_{max}_{AKAP79}: 1828 \pm 521 pA para la condición AKAP79-GFP. No se observaron diferencias significativas entre estos parámetros.

Finalmente se evaluó el efecto que AKAP79 podría tener en el tiempo de decaimiento de la porción desensibilizada a concentraciones saturantes de glicina (2000 μ M) en células HEK293 co-transfectadas con RGl α_3 y GFP (control) o AKAP79. Para estos análisis se consideraron células que solo habían sido evocadas con concentraciones saturantes de 2000 μ M de glicina. En la figura 12 podemos observar que no existen diferencias significativas cuando se analiza el parámetro Tau para la porción desensibilizada en ambas condiciones 1584 \pm 697-ms vs 879 \pm 98-ms para la condición control y en presencia de AKAP79 respectivamente.

En conjunto, estos resultados muestran que la sobre-expresión de AKAP79 no generó diferencias significativas en la sensibilidad a agonista del RGl α_3 . Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en el tiempo de decaimiento de la porción desensibilizada de RGl α_3 a concentraciones saturantes de agonista. Estos resultados sugieren que AKAP79 no contribuye directamente a regular la función de RGl.

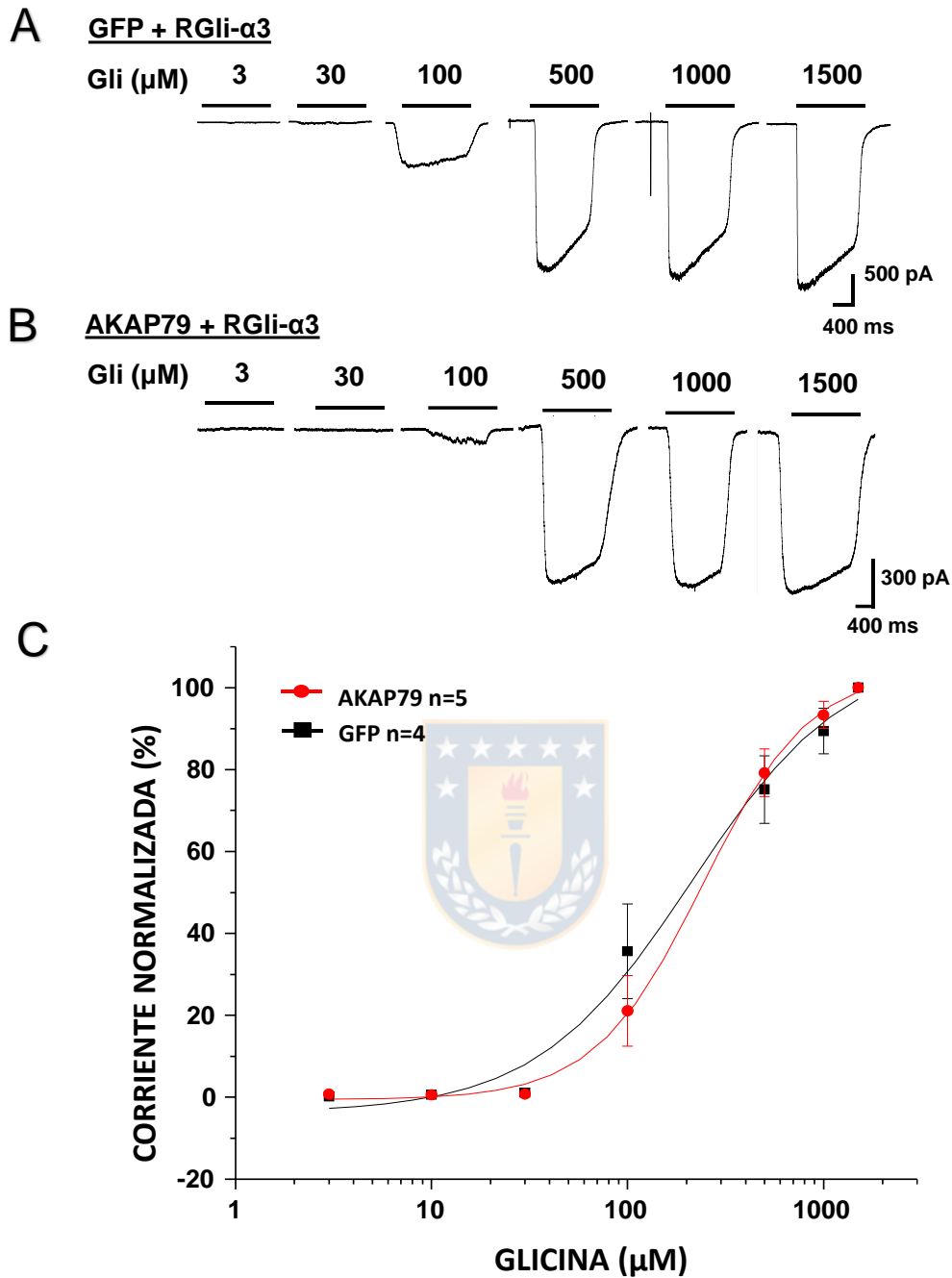


Figura 11. Curva concentración-respuesta de RGli- α_3 en células HEK293. **A)** Gráfico Corrientes glicinérgicas normalizadas (%) versus glicina (μM) en células HEK293 co-expresando RGli- α_3 + AKAP79 (n=5) o RGli- α_3 + GFP (n=4). **B)** Trazos representativos de curva de sensibilidad a agonista en concentraciones crecientes en células HEK293 co-expresando RGli- α_3 y GFP (control). **C)** Trazos representativos de la sensibilidad a agonista en concentraciones crecientes de células HEK293 co-expresando RGli- α_3 y AKAP79. *Panel Derecho.*

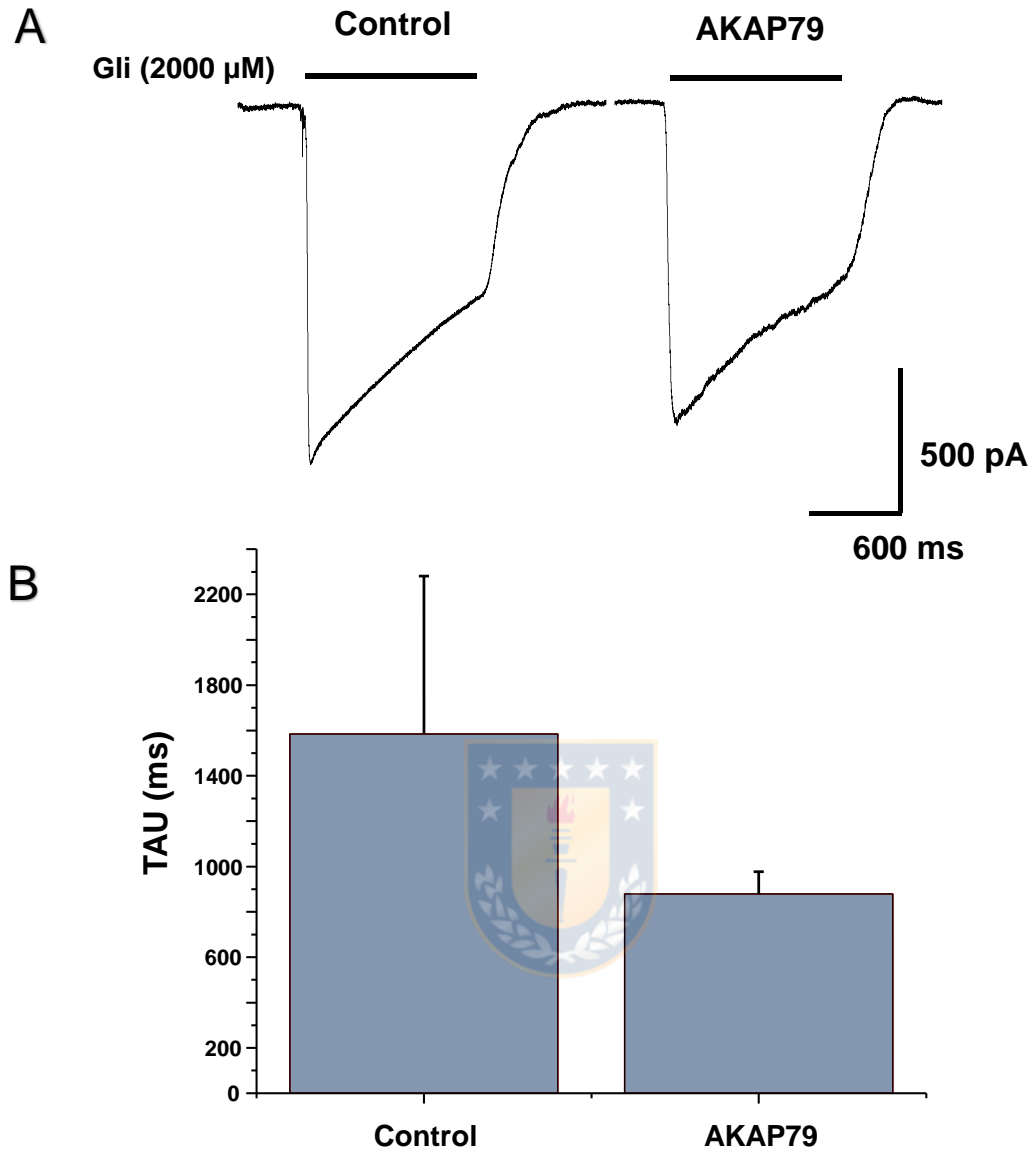


Figura 12. Efecto de AKAP79 en la desensibilización de RGLI- α_3 . **A)** Trazos representativos de corrientes de RGLI- α_3 evocadas por concentraciones saturantes de agonista glicina (2000 μM) en condiciones control (GFP) y AKAP79. **B)** Cuantificación de parámetro Tau (tiempo de decaimiento) en la porción desensibilizada de las corrientes en tiempo constante en condiciones control (GFP) y en presencia de AKAP79. La presencia de AKAP79 no genera diferencias significativas entre ambas condiciones. Datos mostrados en Promedio \pm Error estándar de células expresando GFP (n=4) y AKAP79 (n=10).

Tabla 1. Parámetros cultivo HEK293 sobre-expresando AKAP79-GFP + RGli- α_3 .

Parámetros	RGli- α_3 + GFP	RGli- α_3 + AKAP79
EC₅₀ (μM)	210.79 \pm 78.24	242.10 \pm 19.19
n° Hill	1.10 \pm 0.35	1.58 \pm 13284
Tau (ms)	1584 \pm 697	879 \pm 98



Discusión

Colocalización de AKAP79 con las subunidades alfa del RGlI en células HEK293.

En nuestros resultados pudimos observar que la señal de fluorescencia asociada a GFP-AKAP79 mostró patrones celulares particularmente diferentes a los de células que expresaron GFP. En este contexto, observamos que la morfología de células HEK293 transfectadas con AKAP79-GFP mostraron un patrón más definido en el límite celular, mostrando una pérdida de la forma ovalada observada en los controles. Estudios previos han mostrado que AKAP79-GFP mostró un patrón de expresión mayormente hacia los límites celulares (Dell'Acqua *et al.*, 2002). Esto puede deberse al rol que cumple AKAP79 en un contexto neuronal de mantener micro-dominios post-sinápticos entre receptores de membrana y el citoesqueleto (Zhang *et al.*, 2016). Por ejemplo, la importancia de AKAP79 en procesos de LTP (Smith *et al.*, 2017) se relaciona con el patrón de expresión e interacción con proteínas de membrana como receptores NMDA y AMPA en hipocampo. Ya que este fenómeno ha permitido denotar la importancia en la arquitectura de la densidad postsináptica en grupos neuronales especializados en procesos de LTP, esta relación podría verse replicada en procesos asociados al procesamiento nociceptivo en neuronas espinales.

En cuanto a la toma de imágenes, los parámetros utilizados para obtener puntos de comparación de colocalización fueron Manders y Pearson. El primero, genera un estudio con la capacidad de ver la superposición de píxeles entre ambos canales de una imagen en ambos sentidos (Aaron, Taylor & Chew, 2018). En este caso la superposición de los píxeles de ambos canales depende exclusivamente de la región de interés (ROI) tomada para el análisis. En nuestros resultados acotamos la región al límite celular (región donde ambas proteínas se encontraban mayormente expresadas). Además de la ROI, el tiempo de expresión es relevante para llevar a cabo estos resultados ya que encontramos que ambas proteínas poseían tiempos de expresión diferentes (datos no mostrados). Mientras que las subunidades alfa del RGlI mostraban un patrón en el límite celular en las primeras 12-18 hrs luego de la transfección, AKAP79 mostraba un patrón en el límite celular luego de las primeras 20-22 horas luego de la transfección. En cuanto a la evaluación del número de Pearson, esta entrega información sobre la correlación de intensidad de la señal asociada a un ROI delimitado (Aaron, Taylor & Chew, 2018). Esta correlación se relaciona directamente en la intensidad de la señal detectada al momento de la toma de la imagen.

En nuestro caso, la correlación de intensidad de señal, observadas en histogramas 2D (datos no mostrados) para ambos canales permitió utilizar este parámetro para complementar la superposición de píxeles para poder generar una conclusión completa sobre la relación entre ambas proteínas. Es importante mencionar que los índices estudiados se hicieron sobre receptores con un epítipo de histidina con anticuerpos anti-His6x. Además, AKAP79 fue detectada por la señal emitida por fusión con GFP. Por lo que, debe considerarse que la distancia entre ambas señales influye directamente en la señal detectada y analizada (Musheshe *et al.*, 2018). La falta de anticuerpos específicos de confianza para ambas proteínas es de importancia metodológica para obtener resultados más refinados en este campo. Sin embargo, y considerando todas las limitaciones expuestas, nuestro sistema experimental demuestra que ambas proteínas colocalizan en células HEK293 de manera consistente. Estas observaciones sin embargo no deben extrapolarse directamente a un contexto neuronal. Futuros experimentos en este sentido se hacen necesarios para confirmar nuestros hallazgos a nivel neuronal.

Interacción directa de AKAP79 con el dominio intracelular del RGLI- α_3

Nuestros resultados en los procesos de expresión y purificación fueron variables para las diferentes proteínas. Para la expresión y purificación de AKAP79-GFP, las transfecciones estandarizadas en células HEK293 resultaron positivas ante la detección mediante western blot anti-GFP. Sin embargo, las detecciones de AKAP79-GFP del lisado HEK293 no fueron las esperadas para las cantidades que requería nuestra metodología. Esto podría mejorarse generando estandarizaciones de la lisis celular. Al no existir reportes previos sobre la interacción de ambas proteínas decidimos generar protocolos que nos permitieran explorar de manera preliminar esta hipótesis por lo que en nuestros resultados no fue crítico conocer los rendimientos de las purificaciones de las proteínas de interés, sin embargo, no descartamos generar cuantificaciones para mejorar y optimizar el proceso de purificación.

Por otra parte, nuestro control de interacción GFP no pudo ser detectado en cantidades óptimas para avanzar en nuestra metodología. Sin embargo, se ajustaron nuestros protocolos para usar menor cantidad de insumos. Estas dificultades pudieron deberse netamente a un mal ajuste de la lisis y detección de las proteínas, ya que, al observar la eficiencia de las transfecciones, estas resultan positivas con una fuerte señal en verde lo que nos demuestra una eficiencia de transfección cercana al 70% de las células en cultivo.

Sin embargo, al momento de la lisis lo observado no se relaciona con los resultados de transfecciones observadas al microscopio.

En cuanto a la implementación de expresión y purificación de DIC-RGII- α_3 -GST, esta mostró resultados positivos. La lisis de cultivos bacterianos BL21 fue observada mediante geles en tinción azul de comassie mostrando una banda significativa en el peso molecular esperado. Estos resultados fueron ampliamente optimizados al utilizar-DDM 4%. Este detergente es ampliamente utilizado en purificación de proteína lo que asegura rendimientos estandarizados a menor concentración que otros detergentes usados (Guskov y Stetsenko., 2017).

Por otra parte, la expresión y detección del vector Duet expresando ambas proteínas en un sistema postulaba generar una co-purificación en doble sistema de columnas sin tener la necesidad de obtener ambas proteínas por separado. Sin embargo, al no obtener resultados positivos de detección para AKAP79-Flag se utilizó la porción del RGII- α_3 para continuar con protocolos de interacción. La falta de expresión de AKAP79-Flag puede deberse a detalles en la expresión del vector en cultivos bacterianos. Sin embargo, proponemos en un futuro cercano clonar la porción de AKAP79-Flag en un vector bacteriano diferente para expresar en solitario las cantidades de proteína que necesitamos para generar metodologías de interacción por columnas de afinidad.

Posteriormente, generar modificaciones al protocolo de interacción nos permitió observar si AKAP79-GFP era retenida en una primera columna de afinidad pretratada con DIC-RGII- α_3 -GST y posteriormente en una segunda columna de Ni-NTA a modo de generar un segundo filtro selectivo. Nuestros resultados muestran que al menos una porción es retenida por la columna con DIC-RGII- α_3 -GST. Esto nos sugiere que ambas proteínas podrían interactuar de manera directa. En neuronas sensoriales se ha descrito la interacción entre la proteína TRPV1 y AKAP79 mediante interacción directa con residuos intracelulares (Zhang et al., 2016). Cabe destacar que alineamientos de secuencia entre TRPV1 y RGII- α_3 muestran que ambos canales presentan un alto grado de identidad en los residuos asociados a la interacción TRPV1-AKAP79. La secuencia descrita para la interacción entre TRPV1 y AKAP79 ha sido descrita y utilizada para obtener un péptido de interferencia a esta unión promoviendo efectos moduladores en las propiedades del canal (Schnizler *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). De la misma manera, se observó la interacción directa receptores inhibitorios mediante las subunidades GABA_A- β_1 y GABA_A- β_3 con AKAP79 (Brandon *et al.*,

2003). Estas evidencias son coherentes con nuestras observaciones las cuales indican que en metodologías de “pull down” el dominio intracelular de RGLI- α_3 interacciona con AKAP79. De esta manera, esta interacción podría jugar un rol importante tanto en el andamiaje de RGLI- α_3 en la post-sinapsis como en la modulación de propiedades del canal. Sin embargo, para poder sugerir de pleno la interacción directa entre RGLI- α_3 y AKAP79 se debe optimizar la metodología “pull down”. Aun cuando los resultados bioquímicos de la interacción entre AKAP79 y RGLI- α_3 no son concluyentes futuros experimentos podrían indicar la interacción directa entre ambas proteínas la cual aportaría información sobre la importancia del dominio intracelular de RGLI- α_3 .

Estudiar la función de RGLI- α_3 en células HEK293 sobre-expresando AKAP79 mediante técnicas electrofisiológicas.

Nuestro estudio mostro que las propiedades de RGLI- α_3 en presencia de AKAP79 no fueron alteradas. Sin embargo, estos hallazgos no descartan que la interacción RGLI- α_3 -AKAP79 module los cambios biofísicos en el receptor asociados a la fosforilación vía PKA. La ausencia de cambios funcionales en nuestros ensayos puede deberse a varios factores, dentro de los cuales se encuentra el modelo de estudio considerado para los experimentos. La sobreexpresión de una proteína de membrana fusionada a GFP podría afectar el hecho de visualizar algún efecto que tenga AKAP79 sobre el canal. Esta proteína de aproximadamente 26 kDa podría, por ejemplo, generar desde un impedimento estérico hasta una influencia en zonas específicas de interacción directa en el receptor, la cual no permitiría observar el real efecto de la proteína de anclaje sobre el receptor.

La modulación de AKAP79 sobre diferentes canales iónicos previamente descritos requiere de interacción directa sobre dominios intracelulares de los canales. En el caso de TRPV1 trabajos previos reportan el rol crítico que juega AKAP79 en la sensibilización del canal en neuronas nociceptivas primarias (Fisher *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2016). Procesos inflamatorios inducen la fosforilación de residuos intracelulares en el canal TRPV1 reduciendo el umbral térmico de activación del canal y sensibilizándolo a nuevos estímulos (Jeske *et al.*, 2009). En neuronas del nociceptivas del ganglio dorsal AKAP79 se encuentra en estrecha relación a este fenómeno contribuyendo al fenómeno de fosforilación de residuos intracelulares del canal vía PKA (Zhang *et al.*, 2008). De igual manera la fosforilación del DIC del RGLI- α_3 mediante PKA genera una sensibilización del receptor en neuronas de la asta dorsal de la médula espinal (Harvey *et al.*, 2004). Debido a que nuestros resultados sugieren que AKAP79 y el DIC de RGLI- α_3 interaccionan directamente, se puede

sugerir que en un contexto neuronal AKAP79 formaría parte del complejo mecanismo que produce la fosforilación de RGLI- α_3 , de manera similar a como ocurre con TRVP1. La importancia del dominio intracelular de estos canales ante fosforilaciones hace relacionar el mecanismo de AKAP79 y la capacidad de anclar a PKA y contribuir con micro-dominios funcionales en neuronas nociceptivas (Zhang *et al.*, 2008; Murphy *et al.*, 2019).

Por otra parte, es necesario considerar que experimentos de qPCR no publicados de indican que las células HEK293 tienen un nivel de AKAP79 basal el cual podría estar expresada de forma funcional en membrana (datos no mostrados). Estos resultados podrían sugerir que cualquier efecto modulador de AKAP79 al receptor podría tener un umbral basal que no es posible de alterar utilizando la sobre-expresión de AKAP79-GFP. Además, es posible que la actividad basal de PKA en el modelo celular utilizado hagan aún más difícil observar diferencias provocadas por la sobreexpresión de AKAP79. En este sentido, reportes previos muestran que al aplicar forskolina a neuronas sensoriales del ganglio dorsal, el efecto modulador de AKAP79 fue significativamente amplificado en comparación a su condición control (Schnizler *et al.*, 2008).

Conclusiones

Nuestros resultados mostraron que AKAP79 colocaliza con RGLI- α_3 en células HEK293. Además, pese a no ser completamente concluyentes, nuestros ensayos bioquímicos sugieren que estas proteínas interactúan de forma directa. Finalmente, nuestros resultados electrofisiológicos mostraron que la sobreexpresión de AKAP79 no modificó los parámetros funcionales básicos del RGLI- α_3 . En conjunto, nuestros hallazgos sugieren que AKAP79 podría ser una pieza adicional para la regulación intracelular del RGLI- α_3 . Futuros experimentos en sistemas neuronales contribuirán a definir si AKAP79 es una pieza determinante para la función y modulación de RGLI a nivel sináptico.

Bibliografía

- Ahrens, J., Haeseler, G., Leuwer, M., Mohammadi, B., Krampfl, K., Dengler, R., & Bufler, J. (2004). 2,6-Di-tert-butylphenol, a Nonanesthetic Propofol Analog, Modulates $\alpha 1\beta$ Glycine Receptor Function in a Manner Distinct from Propofol. *Anesthesia & Analgesia*, 99(1), 91-96. doi: 10.1213/01.ane.0000120083.10269.54
- Amaya F, Shimosato G, Nagaono M, Ueda M, Hashimoto S, Tanaka Y, Suzuki H, Tanaka M. NGF and GDNF differentially regulate TRPV1 expression that contributes to development of inflammatory thermal hyperalgesia. *Eur J Neurosci*. 2004; 20:2303–2310. [PubMed: 15525272]
- An Overview of the Top Ten Detergents Used for Membrane Protein Crystallization. (2017). *Crystals*, 7(7), 197. doi: 10.3390/cryst7070197
- Baenziger, J., & Corringer, P. (2011). 3D structure and allosteric modulation of the transmembrane domain of pentameric ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology*, 60(1), 116-125. doi: 10.1016/j.neuropharm.2010.08.007
- Bevan, S., Quallo, T., & Andersson, D. A. (2014). TRPV1. *Handbook of experimental pharmacology*, 222, 207–245. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_9
- Bregman, H., Simard, J. R., Andrews, K. L., Ayube, S., Chen, H., Gunaydin, H., Guzman-Perez, A., Hu, J., Huang, L., Huang, X., Krolikowski, P. H., Lehto, S. G., Lewis, R. T., Michelsen, K., Pegman, P., Plant, M. H., Shaffer, P. L., Teffera, Y., Yi, S., Zhang, M., ... DiMauro, E. F. (2017). The Discovery and Hit-to-Lead Optimization of Tricyclic Sulfonamides as Potent and Efficacious Potentiators of Glycine Receptors. *Journal of medicinal chemistry*, 60(3), 1105–1125. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01496>
- Breitinger, U., Bahnassawy, L., Janzen, D., Roemer, V., Becker, C., Villmann, C., & Breitinger, H. (2018). PKA and PKC Modulators Affect Ion Channel Function and Internalization of Recombinant Alpha1 and Alpha1-Beta Glycine Receptors. *Frontiers In Molecular Neuroscience*, 11. doi: 10.3389/fnmol.2018.00154
- Burzomato, V., Groot-Kormelink, P., Sivillotti, L., & Beato, M. (2003). Stoichiometry of Recombinant Heteromeric Glycine Receptors Revealed by a Pore-Lining Region Point Mutation. *Receptors And Channels*, 9(6), 353-361. doi: 10.3109/714041016
- Carvajal-González, A., Leite, M. I., Waters, P., Woodhall, M., Coutinho, E., Balint, B., Lang, B., Pettingill, P., Carr, A., Sheerin, U. M., Press, R., Lunn, M. P., Lim, M., Maddison, P., Meinck, H. M., Vandenberghe, W., & Vincent, A. (2014). Glycine receptor antibodies in PERM and related syndromes: characteristics, clinical features and outcomes. *Brain : a journal of neurology*, 137(Pt 8), 2178–2192. <https://doi.org/10.1093/brain/awu142>
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*. 2000; 288:306–313. [PubMed: 10764638]
- Caterina, M. (2000). Impaired Nociception and Pain Sensation in Mice Lacking the Capsaicin Receptor. *Science*, 288(5464), 306-313. doi: 10.1126/science.288.5464.306
- Chéry, N., & De Koninck, Y. (1999). Junctional versus Extrajunctional Glycine and GABAAR-mediated IPSCs in Identified Lamina I Neurons of the Adult Rat Spinal Cord. *The Journal Of Neuroscience*, 19(17), 7342-7355. doi: 10.1523/jneurosci.19-17-07342.1999
- Cioffi C. L. (2018). Modulation of Glycine-Mediated Spinal Neurotransmission for the Treatment of Chronic Pain. *Journal of medicinal chemistry*, 61(7), 2652–2679. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00956>
- Colledge, M., Dean, R., Scott, G., Langeberg, L., Huganir, R., & Scott, J. (2000). Targeting of PKA to Glutamate Receptors through a MAGUK-AKAP Complex. *Neuron*, 27(1), 107-119. doi: 10.1016/s0896-6273(00)00013-1
- Curtis D. R., Hosli L. and Johnston G. A. (1967) Inhibition of spinal neurons by glycine. *Nature* 215: 1502–1503
- Davis, J., Gray, J., Gunthorpe, M., Hatcher, J., Davey, P., & Overend, P. et al. (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*, 405(6783), 183-187. doi: 10.1038/35012076
- Dell'Acqua, M. L., Dodge, K. L., Tavalin, S. J., & Scott, J. D. (2002). Mapping the protein phosphatase-2B anchoring site on AKAP79. Binding and inhibition of phosphatase activity are mediated by residues 315–360. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 48796–48802.
- Foster, E., Wildner, H., Tudeau, L., Haueter, S., Ralvenius, W., & Jegen, M. et al. (2015). Targeted Ablation, Silencing, and Activation Establish Glycinergic Dorsal Horn Neurons as Key Components of a Spinal Gate for Pain and Itch. *Neuron*, 85(6), 1289-1304. doi: 10.1016/j.neuron.2015.02.028

- Fraser, I. D. C., Cong, M., Kim, J., Rollins, E. N., Daaka, Y., Lefkowitz, R. J., & Scott, J. D. (2000). Assembly of an A kinase-anchoring protein- β 2-adrenergic receptor complex facilitates receptor phosphorylation and signaling. *Current Biology*, 10, 409–412.
- Gielen, M., & Corringer, P. (2018). The dual-gate model for pentameric ligand-gated ion channels activation and desensitization. *The Journal Of Physiology*, 596(10), 1873-1902. doi: 10.1113/jp275100r
- Gomez, L. L., Alam, S., Smith, K. E., Horne, E., & Dell'Acqua, M. L. (2002). Regulation of A-kinase anchoring protein 79/150-cAMP-dependent protein kinase postsynaptic targeting by NMDA receptor activation of calcineurin and remodeling of dendritic
- Gorski, J. A., Gomez, L. L., Scott, J. D., & Dell'Acqua, M. L. (2005). Association of an Akinase-anchoring protein signaling scaffold with cadherin adhesion molecules in neurons and epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, 16, 3574–3590.
- Grenningloh, G., Pribilla, I., Prior, P., Multhaup, G., Beyreuther, K., Taleb, O., & Betz, H. (1990). Cloning and expression of the 58 kd β subunit of the inhibitory glycine receptor. *Neuron*, 4(6), 963-970. doi: 10.1016/0896-6273(90)90149-a
- Grenningloh, G., Schmieden, V., Schofield, P., Seeburg, P., Siddique, T., & Mohandas, T. et al. (1990). Alpha subunit variants of the human glycine receptor: primary structures, functional expression and chromosomal localization of the corresponding genes. *The EMBO Journal*, 9(3), 771-776. doi: 10.1002/j.1460-2075.1990.tb08172.x
- Guire, E. S., Oh, M. C., Soderling, T. R., & Derkach, V. A. (2008). Recruitment of calcium-permeable AMPA receptors during synaptic potentiation is regulated by CaM-kinase I. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(23), 6000–6009. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0384-08.2008>
- Guo, Y., Bo, T., Zhou, X., Gao, L., Wang, Y., & Zhao, J. (2015). AKAP5 signaling complexes: focal points and functional properties. *Neuro endocrinology letters*, 36(1), 7–14.
- Jeske NA, Diogenes A, Ruparel NB, Fehrenbacher JC, Henry MA, Akopian AN, Hargreaves KM. A-kinase anchoring protein mediates TRPV1 thermal hyperalgesia through PKA phosphorylation of TRPV1. *Pain*. 2008; 138:604–616. [PubMed: 18381233]
- Jeske NA, Patwardhan AM, Ruparel NB, Akopian AN, Shapiro MS, Henry MA. A-kinase anchoring protein 150 controls protein kinase C-mediated phosphorylation and sensitization of TRPV1. *Pain*. 2009; 146:301–307. [PubMed: 19767149]
- Kandel' El. Lechenie bolevykh sindromov metodom khronicheskoi' elektrostimulatsii zadnikh stolbov spinnogo mozga [Treatment of pain syndromes by the technic of chronic electrostimulation of the posterior columns of the spinal cord]. *Zh Vopr Neurokhir Im N N Burdenko*. 1986;(2):41-47.
- Kuner, R., & Flor, H. (2016). Structural plasticity and reorganisation in chronic pain. *Nature Reviews Neuroscience*, 18, 20–30.
- Langlhofer, G., & Villmann, C. (2016). The Intracellular Loop of the Glycine Receptor: It's not all about the Size. *Frontiers In Molecular Neuroscience*, 9. doi: 10.3389/fnmol.2016.00041
- Langosch, D., Thomas, L., & Betz, H. (1988). Conserved quaternary structure of ligand-gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 85(19), 7394-7398. doi: 10.1073/pnas.85.19.7394
- Li, H., Pink, M. D., Murphy, J. G., Stein, A., Dell'Acqua, M. L., & Hogan, P. G. (2012). Balanced interactions of calcineurin with AKAP79 regulate Ca²⁺-calcineurin-NFAT signaling. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19, 337–345.
- Lu, Y., Zhang, M., Lim, I. A., Hall, D. D., Allen, M., Medvedeva, Y., ... Hell, J. W. (2008). AKAP150-anchored PKA activity is important for LTD during its induction phase. *The Journal of Physiology*, 586, 4155–4164.
- Lynagh, T., & Lynch, J. (2010). A glycine residue essential for high ivermectin sensitivity in Cys-loop ion channel receptors. *International Journal For Parasitology*, 40(13), 1477-1481. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.07.010
- Lynch, J. (2004). Molecular Structure and Function of the Glycine Receptor Chloride Channel. *Physiological Reviews*, 84(4), 1051-1095. doi: 10.1152/physrev.00042.2003
- Lynch, J. (2009). Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology*, 56(1), 303-309. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.07.034
- Lynch, J. W., Zhang, Y., Talwar, S., & Estrada-Mondragon, A. (2017). Glycine Receptor Drug Discovery. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*, 79, 225–253. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.01.003>
- Malenka, R. C., & Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: An embarrassment of riches. *Neuron*, 44, 5–21.
- Moraga-Cid, G., San Martín, V., Lara, C., Muñoz, B., Marileo, A., & Sazo, A. et al. (2020). Modulation of glycine receptor single-channel conductance by intracellular phosphorylation. *Scientific Reports*, 10(1). doi: 10.1038/s41598-020-61677-w

- Murphy, J., Crosby, K., Dittmer, P., Sather, W., & Dell'Acqua, M. (2019). AKAP79/150 recruits the transcription factor NFAT to regulate signaling to the nucleus by neuronal L-type Ca²⁺ channels. *Molecular Biology Of The Cell*, 30(14), 1743-1756. doi: 10.1091/mbc.e19-01-0060
- Musheshe, N., Lobo, M. J., Schmidt, M., & Zaccolo, M. (2018). Targeting FRET-Based Reporters for cAMP and PKA Activity Using AKAP79. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 18(7), 2164. <https://doi.org/10.3390/s18072164>
- Nys, M., Kesters, D., & Ulens, C. (2013). Structural insights into Cys-loop receptor function and ligand recognition. *Biochemical pharmacology*, 86(8), 1042–1053. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.07.001>
- Por, E. D., Samelson, B. K., Belugin, S., Akopian, A. N., Scott, J. D., & Jeske, N. A. (2010). PP2B/calcieneurin-mediated desensitization of TRPV1 does not require AKAP150. *Biochemical Journal*, 432, 549–556.
- Prevost, M. S., Moraga-Cid, G., Van Renterghem, C., Edelstein, S. J., Changeux, J. P., & Corringer, P. J. (2013). Intermediate closed state for glycine receptor function revealed by cysteine cross-linking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(42), 17113–17118. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317009110>
- Purkey, A., & Dell'Acqua, M. (2020). Phosphorylation-Dependent Regulation of Ca²⁺-Permeable AMPA Receptors During Hippocampal Synaptic Plasticity. *Frontiers In Synaptic Neuroscience*, 12. doi: 10.3389/fnsyn.2020.00008
- Robertson, H., Gibson, E., Benke, T., & Dell'Acqua, M. (2009). Regulation of Postsynaptic Structure and Function by an A-Kinase Anchoring Protein-Membrane-Associated Guanylate Kinase Scaffolding Complex. *Journal Of Neuroscience*, 29(24), 7929-7943. doi: 10.1523/jneurosci.6093-08.2009
- San Martín, V., Burgos, C., Marileo, A., Lara, C., Sazo, A., & Fuentealba, J. et al. (2019). Inhibitory Actions of Tropeines on the $\alpha 3$ Glycine Receptor Function. *Frontiers In Pharmacology*, 10. doi: 10.3389/fphar.2019.00331
- Smith, F. D., Esseltine, J. L., Nygren, P. J., Veesler, D., Byrne, D. P., Vonderach, M., ... Scott, J. D. (2017). Local protein kinase A action proceeds through intact holoenzymes. *Science*, 1293, 1288–1293.
- Smith, F. D., Reichow, S. L., Esseltine, J. L., Shi, D., Langeberg, L. K., Scott, J. D., & Gonen, T. (2013). Intrinsic disorder within an AKAP-protein kinase A complex guides local substrate phosphorylation. *eLife*, 2, e01319.
- Velázquez-Flores, M. Á., & Salceda, R. (2011). Glycine receptor internalization by protein kinases activation. *Synapse (New York, N.Y.)*, 65(11), 1231–1238. <https://doi.org/10.1002/syn.20963>
- Winkelmann, A., Maggio, N., Eller, J., Caliskan, G., Semtner, M., & Häussler, U. et al. (2014). Changes in neural network homeostasis trigger neuropsychiatric symptoms. *Journal Of Clinical Investigation*, 124(2), 696-711. doi: 10.1172/jci71472
- Xiong, W., Cui, T., Cheng, K., Yang, F., Chen, S. R., Willenbring, D., Guan, Y., Pan, H. L., Ren, K., Xu, Y., & Zhang, L. (2012). Cannabinoids suppress inflammatory and neuropathic pain by targeting $\alpha 3$ glycine receptors. *The Journal of experimental medicine*, 209(6), 1121–1134. <https://doi.org/10.1084/jem.20120242>
- Yalcin, I., Tessier, L. H., Petit-Demoulière, N., Waltisperger, E., Hein, L., Freund-Mercier, M. J., & Barrot, M. (2010). Chronic treatment with agonists of $\beta 2$ -adrenergic receptors in neuropathic pain. *Experimental Neurology*, 221, 115–121.
- Yang, Y., Wang, X.-B., & Zhou, Q. (2010). Perisynaptic GluR2-lacking AMPA receptors control the reversibility of synaptic and spines modifications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 11999–12004.
- Yevenes, G. E., & Zeilhofer, H. U. (2011). Allosteric modulation of glycine receptors. *British journal of pharmacology*, 164(2), 224–236. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01471.x>
- Yévenes, G., & Zeilhofer, H. (2011). Molecular Sites for the Positive Allosteric Modulation of Glycine Receptors by Endocannabinoids. *Plos ONE*, 6(8), e23886. doi: 10.1371/journal.pone.0023886
- Yevenes, G., Moraga-Cid, G., Peoples, R., Schmalzing, G., & Aguayo, L. (2008). A selective G -linked intracellular mechanism for modulation of a ligand-gated ion channel by ethanol. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 105(51), 20523-20528. doi: 10.1073/pnas.0806257105
- Zeilhofer, H. (2005). The glycinergic control of spinal pain processing. *Cellular And Molecular Life Sciences*, 62(18), 2027-2035. doi: 10.1007/s00018-005-5107-2
- Zeilhofer, H., Wildner, H., & Yévenes, G. (2012). Fast Synaptic Inhibition in Spinal Sensory Processing and Pain Control. *Physiological Reviews*, 92(1), 193-235. doi: 10.1152/physrev.00043.2010
- Zhang, J. Y., & Wang, Y. X. (2015). Gelsemium analgesia and the spinal glycine receptor/allopregnanolone pathway. *Fitoterapia*, 100, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.11.002>

- Zhang, J., Carver, C. M., Choveau, F. S., & Shapiro, M. S. (2016). Clustering and functional coupling of diverse ion channels and signaling proteins revealed by superresolution STORM microscopy in neurons. *Neuron*, 92, 461–478.
- Zhang, M., Lu, M., Huang, H., Liu, X., Su, H., & Li, H. (2019). Maturation of thalamocortical synapses in the somatosensory cortex depends on neocortical AKAP5 expression. *Neuroscience letters*, 709, 134374. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134374>
- Zhang, X., Li, L., & McNaughton, P. A. (2008). Proinflammatory mediators modulate the heat-activated ion channel TRPV1 via the scaffolding protein AKAP79/150. *Neuron*, 59(3), 450–461. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.05.015>
- Zhang, Y., Bode, A., Nguyen, B., Keramidas, A., & Lynch, J. W. (2016). Investigating the Mechanism by Which Gain-of-function Mutations to the $\alpha 1$ Glycine Receptor Cause Hyperekplexia. *The Journal of biological chemistry*, 291(29), 15332–15341. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.728592>
- Zhang, Z., Guo, Z., Li, H., He, Y., Duan, X., & Suo, Z. et al. (2019). Ubiquitination and inhibition of glycine receptor by HUWE1 in spinal cord dorsal horn. *Neuropharmacology*, 148, 358-365. doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.02.002

