



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

Determinación de la interacción entre el dominio intracelular de receptor de glicina $\alpha 3$ y la proteína del complejo de exocitosis SEC8

Tesis para optar al grado de Magíster en Neurobiología

Paul Francisco Soto Ortega

Concepción-Chile

2024

Profesor Guía: Dr. Gustavo Moraga-Cid

Departamento de Fisiología

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

Tesis realizada en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Ciencias
Biológicas. Universidad de Concepción

Profesores integrantes del comité evaluador:

Profesor Guía:

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

Comisión Evaluadora:



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

Dr. José Leonardo Guzmán
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Matías Hepp Castro
Facultad de Medicina
Universidad Católica de la
Santísima Concepción

Director del Programa:

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

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer:

A los proyectos FONDECYT 1211095 (GM-C), 1211082 (GY), 11221211 (CFB) y 1200908 (JF), cuyo financiamiento y desarrollo han hecho posible la realización de este trabajo.

En particular, a mi profesor tutor y mentor en este camino, el Dr. Gustavo Moraga Cid, por haberme motivado a seguir estudiando, por enseñarme, apoyarme y brindarme la confianza que me ha permitido desarrollarme como profesional a lo largo de todo este proceso bajo su guía.

A todas las personas que forman parte del Departamento de Fisiología, con las que he tenido la fortuna de compartir, por su disposición para orientarme y apoyarme en mi labor diaria en el laboratorio, tanto profesores como personal.

A David Flaig Lobos y Santiago Quintana Herrera por sus enseñanzas, consejos, orientación profesional, apoyo, críticas constructivas y ayuda constante durante estos años de mi proyecto de tesis.

A los equipos formados por los estudiantes autodenominados **Ma-Patch-e** y **Caracolas**, por su colaboración en la realización de los experimentos y su motivación para avanzar.

A mi esposa, quiero agradecerle su incondicional apoyo, su dedicación, paciencia y amor demostrado desde el momento en que inicié este camino.

Y, por último, pero no menos importante, agradezco a mi familia por su apoyo incondicional, por su confianza en mí, por transmitirme sus impecables valores y principios. A mi madre, Eliana Ortega Castillo, quien siempre está para mí con todo su amor; a mi padre, Hugo Soto Medina, por su apoyo y confianza inquebrantables; y a mi hermano, Hugo Francisco Soto Ortega, por confiar en mí y apoyarme desde siempre.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE DE CONTENIDOS	4
INDICE DE FIGURAS	6
ABREVIATURAS	7
1. RESUMEN	9
2. ABSTRACT	10
3. GRAPHICAL ABSTRACT	11
4. INTRODUCCIÓN	2
4.1 Canales iónicos pentaméricos activados por ligando (PLGICs).....	2
4.2 El receptor de Glicina (GlyRs).....	3
4.3 GlyR alpha3.....	6
4.4 Rol del ICD del GlyR	8
4.5 Sec8.....	10
5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
5.1 Hipótesis	23
5.2 Objetivo General.....	23
5.3 Objetivos Específicos	23
6. METODOLOGÍA.....	24
6.1 Cultivo celular y Transfección.....	24
6.1.1 E. coli BL21 quimiocompetentes y transformación	24
6.2. Ensayos Pull Down	26
6.2.1 Ensayo GST Pull Down	26
6.3.1 Ensayo His Pull Down con Receptor Quimérico Gli- α 3ICD-HA.....	28
6.3.2 Ensayo His Pull Down con Receptor Expresado en Células HEK293.....	29
6.4 Inmunocitoquímica.....	31
6.5 Electrofisiología	33
6.5.1 Electrofisiología con perfusión intracelular de proteína.....	36
6.6 Estructura del dominio intracelular del receptor de glicina α 3.....	37

6.7	Estructura de la proteína del complejo de exocitosis sec8.....	38
6.8	Docking proteína-proteína.....	39
6.9	Análisis de estadísticas	40
7	RESULTADOS	41
7.1	Análisis de la interacción de la proteína del complejo de exocitosis sec8 con el dominio intracelular del receptor de glicina $\alpha 3L$ mediante ensayos pull down.....	41
7.2	Estudios de colocación de sec8 con las subunidades $\alpha 3L$ del receptor de glicina mediante inmunocitoquímica en células HEK293.....	48
7.3	Estudio mediante técnicas de electrofisiología de la interacción del GlyR $\alpha 3$ y la proteína del complejo de exocitosis sec8 sobre expresada en células HEK293	53
7.4	Estudio in silico Docking proteína-proteína entre el ICDRGly $\alpha 3$ y sec8	64
8	DISCUSIÓN	69
8.1	Análisis de la interacción de la proteína del complejo de exocitosis sec8 con el dominio intracelular del receptor de glicina $\alpha 3L$ mediante ensayos pull down.....	69
8.2	Estudios de colocación de sec8 con el receptor de glicina $\alpha 3$ mediante inmunocitoquímica en células HEK293.....	72
8.3	Estudio mediante técnicas de electrofisiología de la interacción del GlyR $\alpha 3$ y la proteína del complejo de exocitosis sec8 sobre expresada en células HEK293.....	2
8.4	Estudio in silico Docking proteína-proteína entre el ICDGlyR $\alpha 3$ y sec8	4
9	CONCLUSIONES.....	6
10	BIBLIOGRAFIA	78

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	13
Figura 2.....	15
Figura 3.....	18
Figura 4.....	21
Figura 5.....	27
Figura 6.....	29
Figura 7.....	31
Figura 8.....	35
Figura 9.....	37
Figura 10.....	42
Figura 11.....	45
Figura 12.....	47
Figura 13.....	51
Figura 14.....	52
Figura 15.....	55
Figura 16.....	56
Figura 17.....	58
Figura 18.....	62
Figura 19.....	63
Figura 20.....	65
Figura 21.....	66
Figura 22.....	68



ABREVIATURAS

GlyR	Receptor de glicina
GlyRs	Receptores de glicina
RGly α 3	Receptor de glicina alfa 3
RGly α 3L	Receptor de glicina alfa 3 isoforma L
RGly α 3s	Receptores de glicina alfa 3 isoforma L
pLGIC	Canales iónicos pentaméricos activados por ligando
ECD	Dominio extracelular
TMD	Dominio transmembrana
ICD	Dominio intracelular
ICD α 3	Dominio intracelular de la subunidad alfa 3
ICD α 3L	Dominio intracelular de la subunidad alfa 3 isoforma L
ICD α 3K	Dominio intracelular de la subunidad alfa 3 isoforma K
α 3	Subunidad alfa 3
α 3L	Subunidad alfa 3 isoforma L
α 3K	Subunidad alfa 3 isoforma K
Sec8	Subunidad del factor de tráfico vesicular sec8
nAChRs	Receptores nicotínicos de acetil colina
GABAARs	Receptores GABA A
GABACRs	Receptores GABA C
GluCl	Canales de cloruro activados por glutamato
PBS	Solución salina equilibrada
GLICICD α 3L	Receptor quimérico bacteriano con el ICD α 3L
IMAX	Intensidad de corriente máxima

TM1-4	Subunidades transmembrana de 1 a 4
SNC	Sistema nervioso central
α 1-4	Subunidades alfa de 1 a 4
β	Subunidades beta
<i>E. coli</i> BL21	Cepa de bacterias para expresión de proteínas
PETDuet	Vector de coexpresión de proteínas
OD	Densidad óptica
GST	Glutation
SDS	Dodecil sulfato de sodio
His	Histidina
HA	Hemaglutinina
FLAG	Octapeptido de marcaje
RGLIC	Receptor bacteriano selectivo
HEK293	Células renales embrionarias humanas
GFP	Proteína fluorescente verde
PFA	Paraformaldehido
JaCob	Just a count blobs
ICDRGly α 3	Dominio intracelular del receptor de glicina alfa3
kDa	Kilodalton

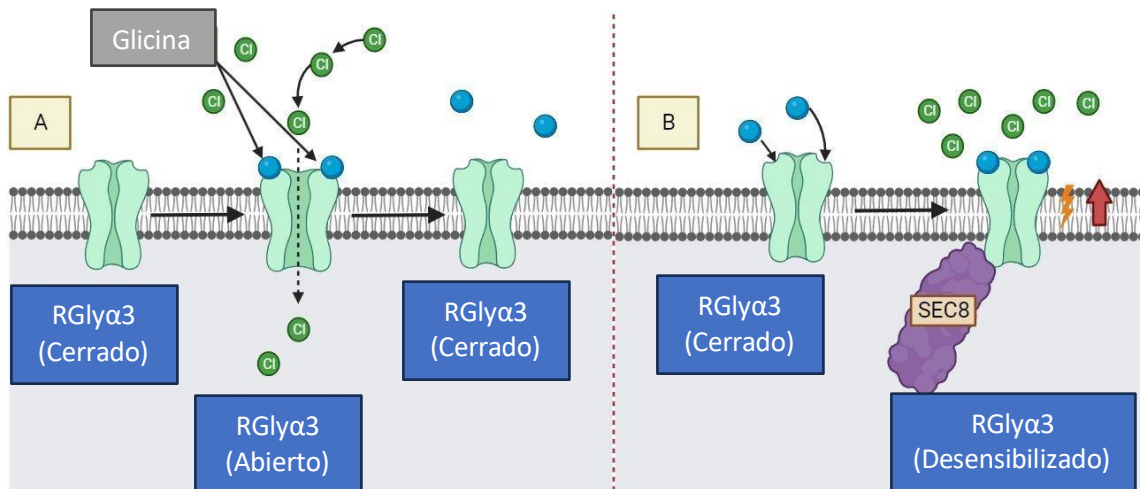
1. RESUMEN

El receptor de glicina (GlyR), es un canal iónico pentamérico activado por ligando (pLGIC), crucial para regular la excitabilidad neuronal, y está implicado en afecciones como la hiperekplexia, el dolor crónico y la epilepsia. GlyR, que comprende cuatro subunidades alfa y una subunidad beta, puede existir en configuraciones homopentamérica (solo α) o heteropentamérica (α y β en una proporción de 4:1). Aunque los moduladores alostéricos históricamente se dirigieron a los dominios extracelular (ECD) y transmembrana (TMD), estudios recientes sugieren una modulación a través del dominio intracelular (ICD) que históricamente estuvo relacionado con la agrupación sináptica. Se descubrió que las proteínas intracelulares Gbeta-gamma mejoran su función. En particular, se identificó una nueva interacción del ICD GlyR $\alpha 3$ con la proteína SEC8, que influye en el transporte y tráfico axonal sin claridad sobre el impacto funcional. Este estudio investiga el efecto funcional de la interacción GlyR-SEC8 utilizando métodos bioquímicos, inmunohistoquímicos y electrofisiológicos. Nuestros resultados revelan un desplazamiento a la izquierda en la curva dosis-respuesta, lo que indica una mayor tasa de desensibilización sin alterar la expresión en la membrana o las corrientes máximas. Estos hallazgos abren nuevas vías para explorar la regulación de GlyR por componentes intracelulares.

2. ABSTRACT

The glycine receptor (GlyR), is a pentameric ligand-gated ion channel (pLGIC), crucial for regulating neuronal excitability, is implicated in conditions such as hyperekplexia, chronic pain, and epilepsy. GlyR, which comprises four alpha subunits and one beta subunit, can exist in homopentameric (α only) or heteropentameric (α and β in a 4:1 ratio) configurations. Although allosteric modulators historically targeted the extracellular (ECD) and transmembrane domains (TMD), recent studies suggest modulation through the intracellular domain (ICD) that was historically related to synaptic clustering. It was discovered that intracellular Gbeta-gamma proteins enhance its function. In particular, a novel interaction of the GlyR $\alpha 3$ ICD with the SEC8 protein was identified, which influences axonal transport and trafficking without clarity on the functional impact. This study investigates the functional effect of GlyR-SEC8 interaction using biochemical, immunohistochemical and electrophysiological methods. Our results reveal a left shift in the dose-response curve, indicating an increased rate of desensitization without altering membrane expression or peak currents. These findings open new avenues to explore the regulation of GlyR by intracellular components.

3. GRAPHICAL ABSTRACT



Graphical abstract: La interacción del receptor de glicina $\alpha 3$ con la proteína del complejo de exocitosis sec8 aumenta la tasa de desensibilización manteniendo el estado desensibilizado del receptor.

4. INTRODUCCIÓN

4.1 Canales iónicos pentaméricos activados por ligando (PLGICs)

Los pLGICs forman una gran familia comprendida por los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs), los receptores de serotonina (5-HT3Rs), los canales activados por zinc (ZAC), los receptores GABAA (GABAARs), los receptores GABAC (GABACRs), los receptores de glicina (GlyRs), y los canales de Cl⁻ activados por glutamato (GluCl)(Alexander et al., 2021; Gielen & Corringer, 2018; Nemecz et al., 2016). Cada uno de estos receptores está constituido por 5 subunidades que al reunirse forman un poro central selectivo. Topológicamente, los PLGICs se dividen en un dominio extracelular (ECD) que contiene el N-terminal donde se localiza el sitio ortostérico (Yevenes & Zeilhofer, 2011), el dominio transmembrana (TMD) que puede albergar sitios de unión de moduladores alostéricos y se compone de 4 segmentos transmembrana (TM1-4), el segmento TM2 delimita el poro que permite el flujo selectivo de iones cuando el canal se encuentra en su conformación abierta, mientras que el dominio intracelular (ICD) conecta el TM3 y TM4 tiene un extremo C-terminal y su función principal está asociada a la movilidad del receptor a través de la membrana celular, anclaje, interacciones intracelulares y modificaciones

postraduccionales como la ubiquitinación y fosforilación (Figura 1) (Baenziger & Corringer, 2011; Du et al., 2015; Huang et al., 2015; Lynch, 2004).

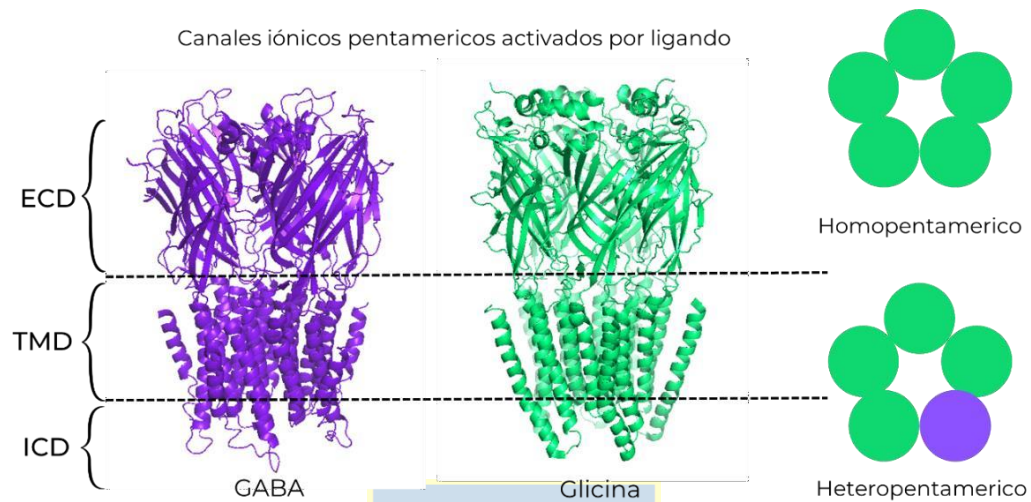


Figura 1. Arquitectura general y topológica de los PLGICs: A) Se muestran los dominios extracelulares, transmembrana e intracelular de los canales iónicos pentaméricos activados por ligando, B) se observa los tipos de conformaciones que pueden tener respecto a sus subunidades (heteropentamerica o homopentamerico).

4.2 El receptor de Glicina (GlyRs)

Los GlyRs pertenecen a la familia de los pLGICs compartiendo su topología y arquitectura general. Son canales permeables a los aniones cloruro. Permiten el control de la excitabilidad neuronal debido a que median la neurotransmisión inhibitoria en el sistema nervioso central (SNC) e intervienen de forma importante las funciones neurofisiológicas, como la coordinación motora, el control respiratorio, el tono muscular y el procesamiento del dolor (Legendre, 2001;

Victoria P. San Martín et al., 2022). A la fecha se han descrito una subunidad β y cuatro subunidades α (α 1-4) compartiendo un alto grado de la identidad de secuencia ($\approx$ 75%) entre ellas. Sin embargo, a pesar de su gran similitud, poseen grandes diferencias en sus propiedades biofísicas, farmacológicas y de distribución en la SNC (Lynch, 2009; Zeilhofer et al., 2018; Zeilhofer et al., 2012).

Los receptores de glicina pueden encontrarse en dos tipos de conformaciones una homopentamerica compuesta solo por subunidades α y otra heteropentamerica compuesta por subunidades α y β (figura 1B). Las subunidades β no forman canales homomericos funcionales, pero son claves en la agrupación y estabilización de los GlyRs en la sinapsis a través de la interacción del ICD de la subunidad β con la proteína de andamiaje gepirina (Lynch, 2009; Zeilhofer et al., 2018; Zeilhofer et al., 2012). Los GlyRs se encuentran principalmente en las membranas de las motoneuronas de la medula espinal adulta, tronco encefálico y retina. Se diferencian en su expresión a lo largo del SNC: α 1 se expresa a lo largo de la medula espinal y el tronco encefálico contribuyendo a funciones fisiológicas esenciales (Takazawa et al., 2017; Z. Y. Zhang et al., 2019), α 2 se expresa escasamente en el cuerno dorsal de la medula espinal de mamíferos y se relaciona principalmente con mecanismos de plasticidad referidas al dolor neuropático (Imlach et al., 2016; Lynch, 2009; Zeilhofer et al., 2012) y α 3 se reportado en las láminas superficiales del cuerno dorsal, hipotálamo, sistema auditivo y tronco encefálico contribuyendo en funciones fisiológicas como el ritmo respiratorio, audición y el dolor inflamatorio

crónico (Eichler, 2008; Baer, 2009; Manzke, 2010; Victoria P. San Martín et al., 2022; Zeilhofer et al., 2021).

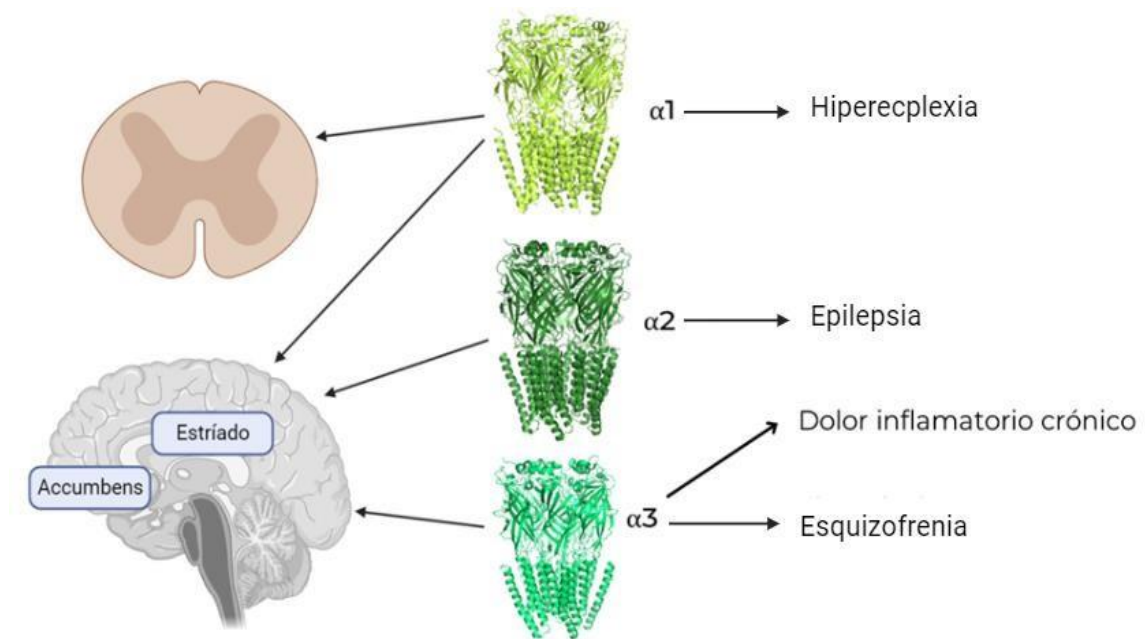


Figura 2. Expresión de los receptores de glicina a lo largo del SNC: $\alpha 1$ se expresa a lo largo de la medula espinal y el tronco encefálico, $\alpha 2$ se expresa escasamente en el cuerno dorsal y $\alpha 3$ está restringida a las láminas superficiales del cuerno dorsal, regiones del encéfalo como el hipocampo, núcleo accumbens y estriado.

Las alteraciones producidas en la inhibición glicinérgica a nivel funcional o en el deterioro de los GlyR desencadenan enfermedades neurológicas. En los receptores $\alpha 1$ por ejemplo se relacionan con la hiperecplexia (Schaefer et al., 2013), las mutaciones en la subunidad $\alpha 3$ se han relacionado con el dolor crónico (Lynch, 2009; Zeilhofer et al., 2012). Las alteraciones en el procesamiento del ARN de las subunidades $\alpha 3$ generan receptores hiperactivos, que se han

relacionado con la epilepsia (Luís, 2012). Además, se ha demostrado que la inhibición funcional de la asta dorsal espinal por RGly α 3s es un mecanismo crítico en la hipersensibilidad al dolor inducida por la inflamación (Harvey et al., 2004). Además, los RGly α 3s también se han implicado en la modulación de los ritmos respiratorios (figura 2) (Victoria P. San Martín et al., 2022).

4.3 GlyR alpha3

Los GlyRs homopentaméricos que están formados por subunidades α 3 han tomado relevancia debido a evidencia que muestra su importancia en patologías como el dolor inflamatorio crónico (Hussein et al., 2019; V. P. San Martín et al., 2022). Además, estudios de inmunohistoquímica y electrofisiología realizados muestran la expresión de GlyR α 3 homopentaméricos en regiones del encéfalo como el hipocampo, núcleo accumbens y estriado (Bergstrom et al., 2020; Everitt & Robbins, 2005). Estudios knock-out para el gen que codifica la subunidad α 3 de GlyR demostraron un rol importante en la mantención y regulación de la inhibición tónica de los núcleos neuronales como el accumbens relacionando así los GlyR α 3 con las funciones superiores como la cognición, emoción y miedo (Dalley et al., 2004). Por otra parte, el estriado posee aferencias a los núcleos de los ganglios basales, ampliamente caracterizados por su directa relación con el sistema de recompensa, aprendizaje y memoria. Por lo que GlyR α 3 es un prometedor blanco terapéutico (Hawes et al., 2015; Packard & Knowlton, 2002).

Por otro lado, los receptores de glicina $\alpha 3$ poseen dos isoformas posibles $\alpha 3L$ y $\alpha 3K$ (Figura 3). La exclusion del exon 8 del ARNm que codifica RGly $\alpha 3$ resulta en la variante $\alpha 3K$ que carece de 15 aminoacidos (TEAFLEKFYRFSDT) en el bucle intracelular entre TM3 y TM4. RGly $\alpha 3L$ es la variante predominante de un cerebro sano en una proporción de 5:1 con la variante RGly $\alpha 3K$ que se localiza principalmente somadendríticamente, mientras que $\alpha 3L$ se localiza principalmente en la presinapsis debido a la interacción con el factor de tráfico vesicular sec8, donde el receptor de glicina $\alpha 3$ regula la liberación de neurotransmisores. (Eichler et al., 2009; Meier et al., 2014; Ruiz et al., 2010; Waseem & Fedorovich, 2010; Winkelmann et al., 2014; Zhang et al., 2008).



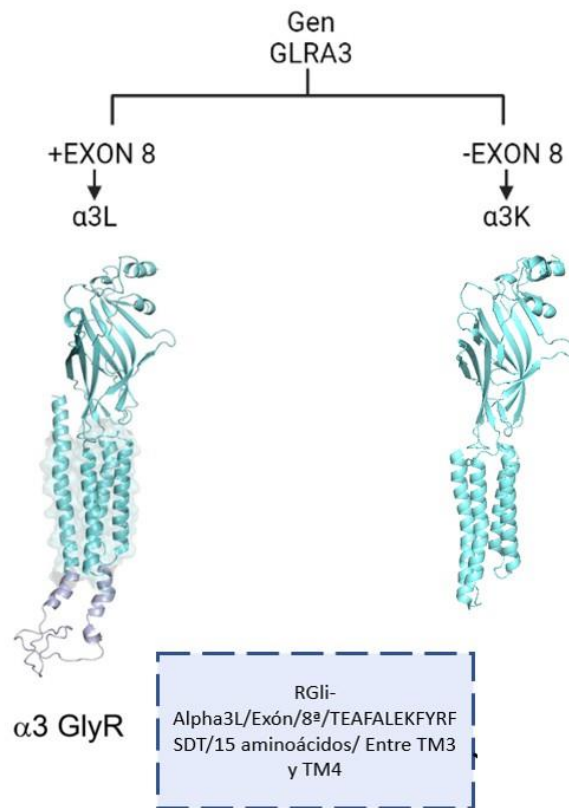


Figura 3. Diferencias entre las variantes del GlyR α 3: loop intracelular más largo para la variante α 3L y corto α 3K que no contiene los 15 aminoácidos.

4.4 Rol del ICD del GlyR

El dominio intracelular del receptor de glicina (GlyR) se ubica entre las hélices TM3 y TM4, presentando un largo bucle compuesto por aproximadamente 80 aminoácidos (Cascio, 2004). La estructura precisa de este bucle aún no se ha determinado con exactitud, ya que, durante la purificación del receptor de glicina en eucariontes con miras a su cristalización, el dominio intracelular (ICD, por sus siglas en inglés) se sustituye por un péptido conector de tres aminoácidos. Esta

sustitución se lleva a cabo debido a la alta flexibilidad del ICD, la cual impide su conservación durante el proceso (Bregman et al., 2017; Langlhofer & Villmann, 2016). Aunque actualmente se ha logrado modelar la estructura completa de dos isoformas del receptor de glicina utilizando la inteligencia artificial AlphaFold2 y ajustándola mediante sus interacciones electrostáticas, Igualmente se carece de una estructura experimental definitiva del ICD (Thompson et al., 2023).

Históricamente, se ha asociado la función del dominio intracelular con la movilidad del receptor a lo largo de las células neuronales (Dumoulin et al., 2010). Sin embargo, en la actualidad, se está prestando una creciente atención a las interacciones entre el ICD y componentes intracelulares específicos, como HUWE1 y la proteína G, que tienen la capacidad de modular la funcionalidad del receptor de glicina (Yevenes et al., 2006; Z.-Y. Zhang et al., 2019). Recientemente se ha registrado la posible interacción con componentes intracelulares como la proteína del complejo de exocitosis sec8 (Langlhofer & Villmann, 2016; Lemmens et al., 2022; Winkelmann et al., 2014). Este enfoque emergente destaca la importancia de comprender las complejas interacciones que regulan la actividad del receptor a nivel intracelular y su mecanismo para nuevas vías farmacológicas.

4.5 Sec8

La proteína Sec8, también conocida como Sec8p, es un componente intracelular y del complejo de exocitosis que está formado por las proteínas Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo84 y Exo70 con pesos comprendidos entre 70kDa y 110kDa (TerBush et al., 1996). El complejo de exocitosis se encarga del proceso de secreción de vesículas en las células eucariotas (Hsu et al., 2004). La exocitosis es un mecanismo crucial mediante el cual las células liberan productos, como hormonas, enzimas y neurotransmisores, desde vesículas intracelulares hacia el exterior de la célula. Estas proteínas trabajan en conjunto para coordinar y regular la exocitosis en diversas células y tejidos (He & Guo, 2009). Sec8 desempeña un papel fundamental en la regulación de la secreción celular. Controla la fusión específica de las vesículas con la membrana plasmática, lo que asegura la liberación precisa de su contenido (Figura 4) (Bustos, 2019; Patrizio et al., 2017).

En el SNC, la exocitosis mediada por el complejo de exocitosis y proteínas como Sec8 es esencial para la liberación de neurotransmisores en las sinapsis, permitiendo la comunicación entre neuronas, la distribución de los receptores a lo largo de las neuronas por medio del tráfico axonal y la transmisión de señales nerviosas (Lemmens et al., 2022; Winkelmann et al., 2014). Sec8 es capaz de interaccionar de forma directa con los otros componentes del complejo e inclusive con receptores NMDA y AMPA (Gerges et al., 2006; Sans et al., 2003). A su vez

se reportó una interacción directa con el RGly α 3 (Dutertre et al., 2012; Lynch et al., 2017; Winkelmann et al., 2014). Mientras tanto y de momento el resto de los componentes del complejo de exocitosis no han reportado interacciones directas con otros receptores de la familia de los PLIGCs capaces de modular su función.

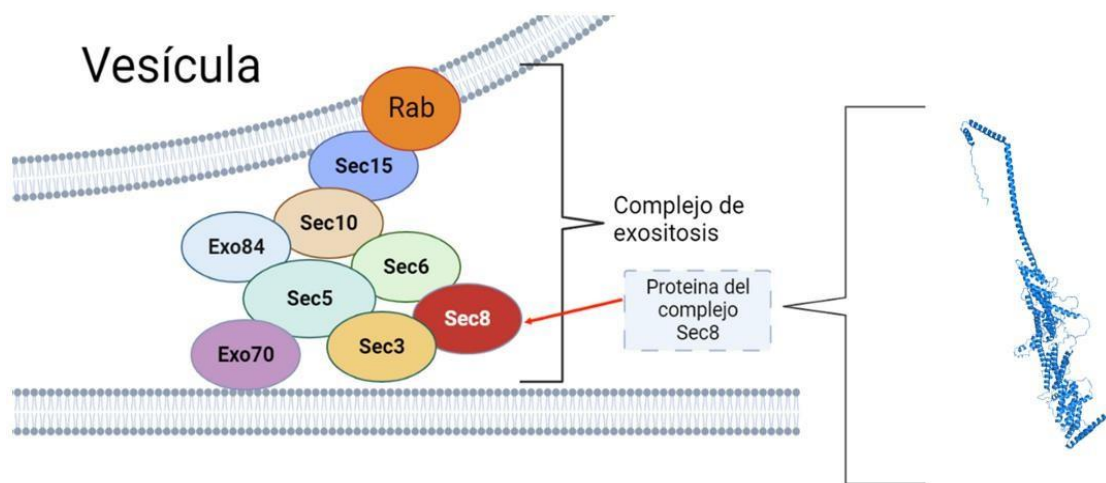


Figura 4. Esquema de localización intracelular de la proteína del complejo de exocitosis sec8: Localización dentro del complejo de exocitosis cercana a la membrana y estructura predicha de sec8.

RGly α 3 es un componente importante en la regulación de las redes neuronales y está relacionado con patologías como el dolor crónico y esquizofrenia. SEC8 interacciona directamente con RGly α 3 siendo capaz de movilizar a RGly α 3L hacia las localizaciones presinápticas, la interacción de la isoforma L del receptor α 3 radica en que este posee 15 aminoácidos extra en el dominio intracelular con respecto a su variante K. Por lo que esta interacción se relaciona estrechamente con el ICD del RGly α 3. Como anteriormente se describió que existen interacciones de componentes

intracelulares con ICD de receptores de glicina capaces de modular su función. No obstante, se desconoce completamente el impacto que tendría esta interacción en la función y modulación del RGly α 3 lo que plantea la siguiente pregunta ¿La interacción de SEC8 con el ICD RGly α 3 tiene impacto en su función?



5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

5.1 Hipótesis

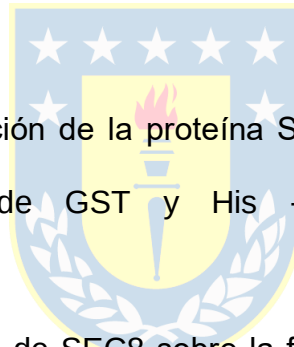
La interacción de la proteína SEC8 con el ICD del RGly α 3 modula la función del receptor.

5.2 Objetivo General

Determinar el impacto de la interacción de la proteína SEC8 con el ICD sobre la función del RGly α 3 mediante técnicas bioquímico, bioinformáticas y biofísicas.

5.3 Objetivos Específicos

1. Determinar la interacción de la proteína SEC8 con el ICD del RGly α 3L mediante ensayos de GST y His -pull down y estudios de inmunocitoquímica.
2. Determinar el impacto de SEC8 sobre la función del RGly α 3L mediante registros electrofisiológicos de célula completa.
3. Investigar los determinantes moleculares y residuos de aminoácidos que median la posible modulación alostérica del RGly α 3L por SEC8.



6. METODOLOGÍA

6.1 Cultivo celular y Transfección

Células HEK293 fueron cultivadas según protocolos estandarizados en nuestro laboratorio. Para la transfección transitoria, las células fueron co-transfectadas utilizando Lipofectamina 2000. Se emplearon 1,5 µg del plásmido codificante para la subunidad α 3L y subunidad α 3K del receptor de glicina, 1 µg de plásmido codificante para la proteína sec8 y 1 µg del plásmido codificante para GFP como indicador de transfección positiva. Todos los plásmidos se mezclaron y se añadieron a una solución de Opti-MEM® (Invitrogen), la cual fue aplicada directamente sobre las células. El análisis de estas células se realizó después de un periodo de 18-24 horas post transfección.

6.1.1 E. coli BL21 quimiocompetentes y transformación

Para preparar bacterias *E. coli* BL21 quimiocompetentes, primero se cultivó una colonia de *E. coli* BL21 (DE3) en 5 mL de medio LB sin antibiótico. Este cultivo se incubó a 37°C con agitación (~200 rpm) durante toda la noche. Al día siguiente, se tomó 1 mL del cultivo nocturno y se diluyó en 100 mL de medio LB fresco, incubándose a 37°C con agitación hasta que la densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) alcanzó un valor entre 0.4 y 0.6, lo que ocurrió generalmente en 2 a 3 horas. Una vez alcanzada la OD_{600} deseada, el cultivo se transfirió a tubos Falcon de 50 mL fríos en hielo y se centrifugó a 4°C y 4000 rpm durante 10 minutos. Tras centrifugar,

se eliminó el sobrenadante cuidadosamente y se resuspendieron las células en 20 mL de solución fría de CaCl₂ al 100 mM, incubándose en hielo durante 20-30 minutos.

Luego, se centrifugaron nuevamente las células a 4°C y 4000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 5 mL de CaCl₂ al 100 mM frío. Para almacenarlas, se añadió un volumen igual de glicerol estéril al 15% y se mezcló suavemente. Finalmente, se alicuotaron en fracciones de 50 µL y se almacenaron a -80°C.

Para la transformación de *E. coli* BL21 quimiocompetentes con plásmidos, se comenzó descongelando un tubo de bacterias quimiocompetentes en hielo. Mientras tanto, se prepararon placas de LB agar con el antibiótico de selección adecuado y se dejaron a temperatura ambiente. Una vez que las bacterias estuvieron descongeladas, se añadieron entre 1-5 µL de plásmido (concentración 10-100 ng) a 50-100 µL de bacterias quimiocompetentes en un tubo Eppendorf frío, mezclando suavemente para no dañar las células. Posteriormente, la mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos.

Tras la incubación en hielo, se realizó un shock térmico colocando el tubo en un baño de agua a 42°C durante 45-60 segundos, seguido de una rápida transferencia a hielo por 2 minutos más. Luego, se añadieron 450-950 µL de medio SOC (o LB sin antibiótico) estéril al tubo y se incubaron las células a 37°C con agitación durante 45-60 minutos para permitir la recuperación y expresión del gen de resistencia al antibiótico. Una vez completada la incubación, se tomaron entre 100-200 µL de la

mezcla y se sembraron en placas de LB agar con antibiótico, utilizando una espátula estéril o perlas de vidrio para esparcir la muestra.

Las placas se incubaron boca abajo a 37°C durante la noche (12-16 horas).

6.2. Ensayos Pull Down

6.2.1 Ensayo GST Pull Down

Bacterias quimiocompetentes de la cepa *E. coli* BL21 fueron transformadas con 1 µg de un plásmido bicistrónico (PETDuet GSTICDα3L-His+SEC8-flag) que codifica para GSTICDα3L-his y la proteína sec8-flag en placas con antibióticos. Posteriormente, se cultivaron en medio LB con antibiótico hasta alcanzar una densidad óptica (OD) superior a 0,6. Una vez alcanzada la densidad óptica adecuada se agrega 1ml de IPTG 1mM. Los cultivos fueron centrifugados a 5000 rpm a una temperatura de 4 °C, resuspendidos en un tampón de lisis (10mM Tris; 10mM EDTA; 1% Triton X-100 + cóctel de inhibidores de proteasas/pH: 7.5) y luego sometidos a sonicación durante 15 minutos en ciclos (15 segundos encendido, 45 segundos apagado, a 70% de amplitud). A continuación, se centrifugó durante 1 hora a 13000 rpm a 4 °C. Después de la última centrifugación, se separó el pellet del sobrenadante. El sobrenadante se incubó en una columna de glutatión (GST) durante 24 horas a 4 °C. Posteriormente, se dejó precipitar la fracción sin retenerla. La columna se lavó dos veces con un volumen de buffer de lavado (50mM NaCl; 20mM Tris; 15mM Imidazol/pH: 7.5) cinco veces mayor al de la resina. Luego, se añadió buffer de elución (50mM NaCl; 20mM Tris; 1M Imidazol/pH: 7.2) con un volumen cinco veces mayor al volumen de la resina. Posteriormente, se evaluó una muestra de cada fracción

mediante un gel SDS al 10% de acrilamida y un Western blot utilizando anticuerpos anti-his y anti-flag (Figura 5).

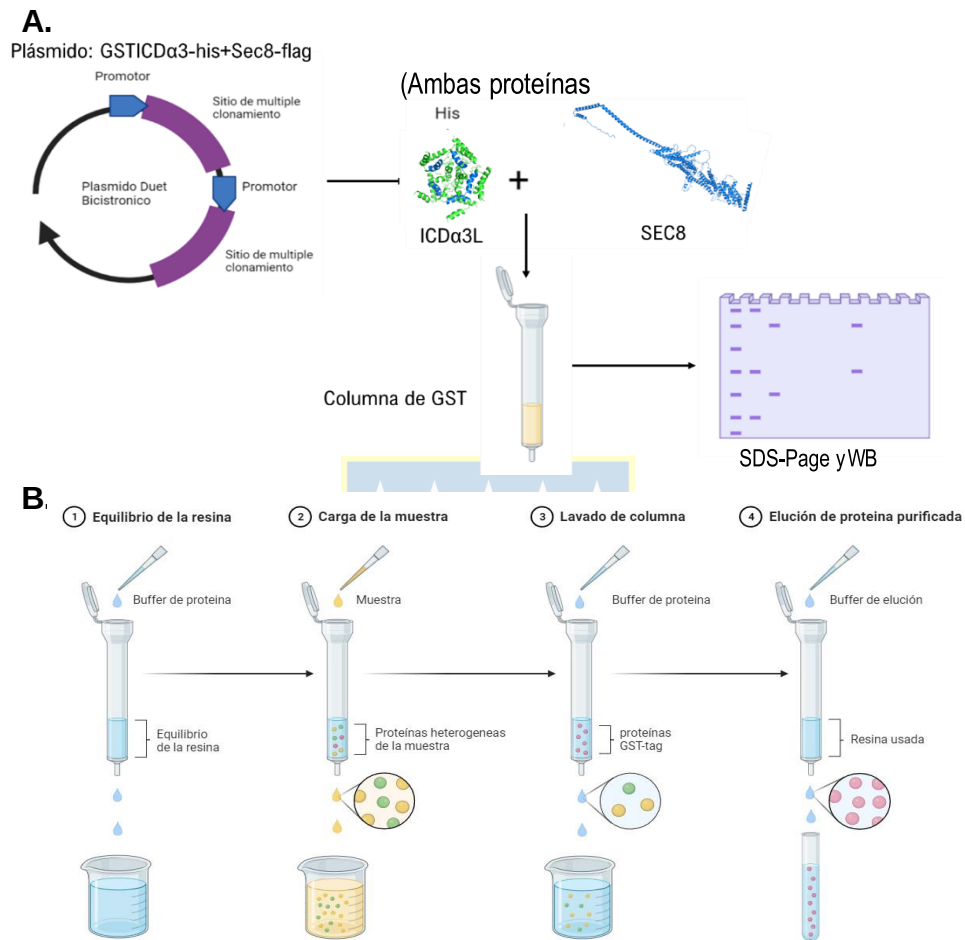
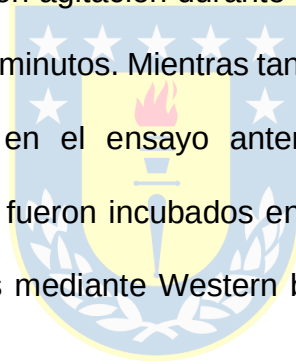


Figura 5. Secuencia de protocolo de purificación con plásmido bicistónico: A) Muestra la composición de un plásmido bicistónico con dos sitios de multiple clonamiento que codifica para las proteínas GSTICD α L-his y sec8-flag para su expresión en cultivos de bacterias y posterior ensayo GST pull down y Western blot. B) Secuencia de ensayo GST-pull down para ensayo de coprecipitación mediante Western blot.

6.3.1 Ensayo His Pull Down con Receptor Quimérico Gli- α 3ICD-HA

Se realizaron transformaciones en bacterias *E. coli* BL21 quimiocompetentes con 1 μ g de un plásmido bicistrónico GLICICD α 3L-HA + sec8-his, utilizando el mismo procedimiento que en el ensayo GST Pull Down, pero con resina de Ni-NTA (His) como método de captura. La última centrifugación se llevó a cabo a 30,000 rpm a 4°C con un volumen mínimo de 50ml durante una hora para separar nuevamente el sobrenadante del pellet. Al pellet se le añadió buffer detergente DDM al 2% y fue incubado con agitación durante 12 horas, luego centrifugado a 13,000 rpm a 4°C durante 30 minutos. Mientras tanto, el sobrenadante fue tratado de la misma manera que en el ensayo anterior. Posteriormente, tanto el sobrenadante como el pellet fueron incubados en columnas separadas durante 24 horas a 4°C y analizados mediante Western blot con anticuerpos anti-HA y anti-His (Figura 6).



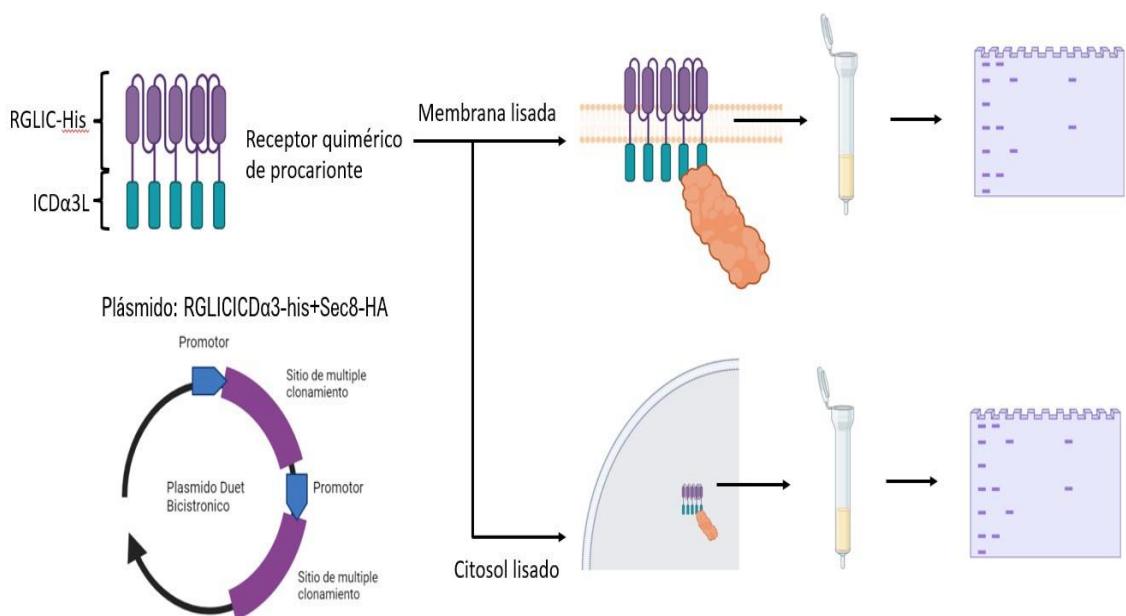
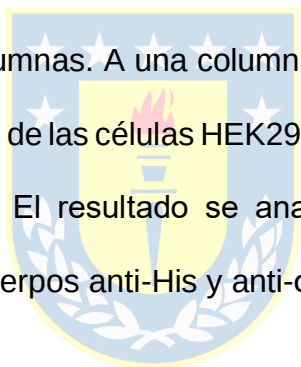


Figura 6. Esquema de separación de lisados para posterior análisis western blot: Se muestra la expresión del receptor quimérico RGLIC-His y ICDα3L y la posterior separación del sobrenadante y pellet para luego ser analizados mediante Western blot.

6.3.2 Ensayo His Pull Down con Receptor Expresado en Células HEK293

Bacterias *E. coli* BL21 fueron transformadas con 1μg de plásmido sec8-His utilizando el procedimiento descrito en el ensayo His-Pull Down. Simultáneamente, se transfectaron transitoriamente células HEK293 usando lipofectamina 2000 con 1.5μg de un plásmido que codifica para la subunidad α3L del receptor de glicina y 1μg de un plásmido que codifica para GFP como marcador de transfección positiva. Estos plásmidos fueron añadidos a una solución de Opti-MEM (Invitrogen) y aplicados directamente sobre las células.

Después de 24 horas de incubación, las células fueron centrifugadas a 5000 rpm a 4°C durante 30 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet fue re-suspendido en buffer de lisis (10mM Tris; 10mM EDTA; 1% Triton X-100 + cóctel de inhibidores de proteasas/pH: 7.5). Posteriormente, se expuso a ciclos del sonicador durante 3 minutos (15 segundos encendido, 45 segundos apagado, 70% de amplitud), luego se centrifugó la muestra a 13,000 rpm durante 40 minutos a 4°C. El pellet fue tratado con buffer detergente DDM al 2% durante 12 horas y luego centrifugado a 13,000 rpm a 4°C durante 20 minutos. Luego, se incubó durante 24 horas a 4°C el sobrenadante obtenido de la purificación de la proteína sec8-His en dos columnas. A una columna se le agregó el pellet y en la otra el sobrenadante obtenido de las células HEK293 que expresaron la subunidad $\alpha 3L$ del receptor de glicina. El resultado se analizó mediante un estudio de Western blot utilizando anticuerpos anti-His y anti- $\alpha 3$ (Figura 7).



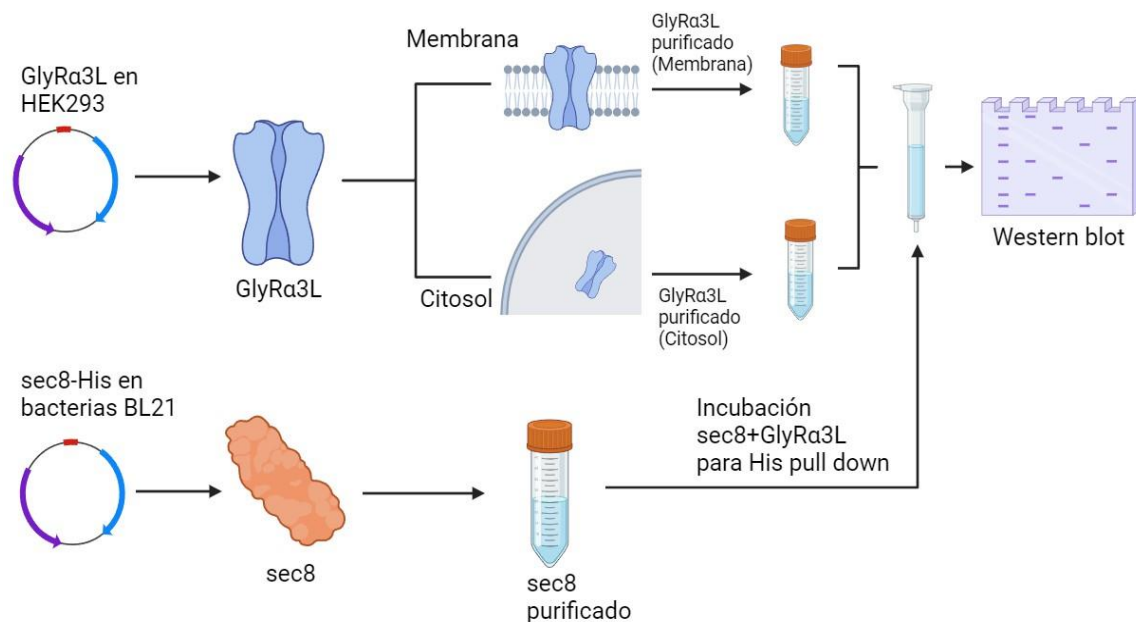


Figura 7. Esquema de purificación de proteína en bacterias *E. coli* BL21 y células HEK293: Se muestra la expresión y purificación de ambas proteínas en paralelo en distintas líneas celulares, se separó la proteína del receptor en lisado de membrana y citosol para luego incubarlos con sec8 en una columna de Ni-NTA para posterior análisis Western blot.

6.4 Inmunocitoquímica

Las células HEK293, previamente cotransfectadas con plásmidos que codifican para la subunidad $\alpha 3L$ del receptor de glicina y sec8, fueron incubadas en una cámara húmeda con medio de cultivo, según se describe en San Martín et al. (2019). Posteriormente, las células fueron lavadas tres veces con PBS e incubadas con los anticuerpos primarios contra 6xHis-ratón y contra $\alpha 3$ -conejo, en una dilución 1:500, suplementada con suero de caballo al 10% en PBS, durante 24 horas a 4°C. Luego, las células fueron lavadas tres veces por 2 minutos con medio de cultivo y finalmente fijadas con PFA al 4% durante 15

minutos a 4°C. Se lavaron las células tres veces con PBS 1X durante 3 minutos cada uno y se bloquearon con suero de caballo al 10% durante 5 minutos.

La incubación del anticuerpo secundario FITC anti-ratón y Cy3 anti-conejo (Jackson Immuno Research Laboratories, USA) se llevó a cabo en una dilución 1:200 en suero de caballo al 10% en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente, en una cámara húmeda y en la oscuridad. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS 1X, cada uno durante 3 minutos. Luego, las muestras se montaron con medio de montaje (Fluorescence 17 Mounting Medium, Dako Cytomation Dako, USA). Las muestras fueron analizadas en un microscopio confocal espectral modelo LSM780 NLO (Centro de Microscopia Avanzada, CMA, UdeC). Se capturaron imágenes en dos canales (rojo y verde) y se analizaron planos de 1 μm en el eje z de cada célula, con hiperstacks aproximados de 17 cortes.

6.5 Electrofisiología

Soluciones:

Solución Externa: 150 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM glucosa, 10 mM HEPES. La solución fue ajustada a un pH de 7.4 y a una osmolaridad entre 320-330 mOsm, guardándose a 4°C hasta su utilización. Solución Interna: 120 mM CsCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM ATP-Na₂, 10 mM BAPTA, 0.5 mM GTP, 10 mM HEPES. Esta solución se ajustó a un pH de 7.35-7.4 y una osmolaridad de 290-310 mOsm, almacenándose a -20°C.

La solución "stock" de glicina 10 mM se preparó utilizando Glicina hidrocloreuro (Sigma) y se combinó con la solución externa en viales de 20 ml, obteniendo concentraciones de 3, 10, 30, 60, 100, 300 y 1000 μ M de glicina. Las pipetas se fabricaron con capilares de borosilicato mediante el uso de un puller vertical (Narishige PC-100) y una microforja (MF-830, Narishige Japan), logrando pipetas con una resistencia de 3-6 M Ω para el modo célula completa. Registros Electrofisiológicos: Los registros electrofisiológicos se llevaron a cabo en modo célula completa (Whole-cell) (Figura 8). Se incorporó la solución interna en la micropipeta, conectándola 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 de GFP, utilizando filtros para FITC en el microscopio. Los registros se realizaron en condiciones RGly α 3L+GFP+sec8, RGly α 3K+GFP+sec8 y en el control negativo

RGly α 3L + GFP, RGly α 3K+GFP.

Manteniendo un potencial de membrana de -60 mV, las corrientes de glicina fueron evocadas mediante un dispositivo de microperfusión, con concentraciones entre 3-1000 μ M. Estas corrientes fueron registradas por un amplificador EPC10 (HEKA Electronics, Alemania) y almacenadas en el software de PatchMaster (HEKA Electronics, Alemania). Todos los registros analizados fueron cuantificados mediante ClampFit 9.0 (Axon Instruments), donde la conversión de los datos fue obtenida mediante Origin 6.0 (Microcal USA). 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 RGly α 3 en presencia o ausencia de sec8 (cambio en el porcentaje de corriente máxima desensibilizada y el tiempo de decaimiento) mediante registros de célula completa aplicando concentraciones saturantes de agonista durante 4 segundos.

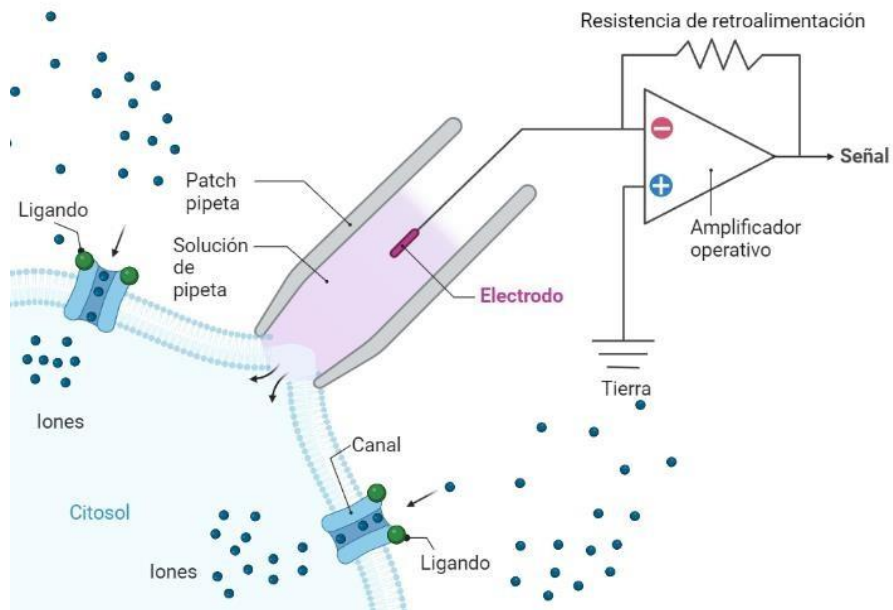
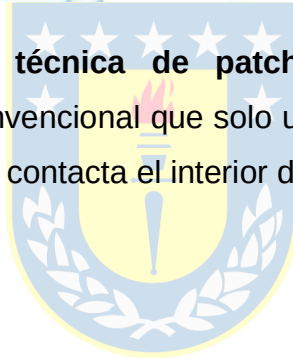


Figura 8. Esquema de técnica de patch clamp célula completa convencional: Técnica convencional que solo utiliza solución intracelular en la punta de borosilicato que contacta el interior de la célula.



6.5.1 Electrofisiología con perfusión intracelular de proteína

Se añadieron 100 μ L de proteína purificada y fraccionada por cromatografía líquida (cromatógrafo, modelo AKTA start, software de control UNICORN™ start 1.0, columna Hitrap), previamente dializada usando un filtro de 100 KDa y PBS a una concentración de 0.13 μ g de sec8, a 500 μ L de solución interna. La incorporación de la proteína de manera intracelular se realizó mediante puntas de borosilicato cargadas con la mezcla de solución interna, utilizando la técnica de Whole cell. Se preparó glicina en viales de solución externa con concentraciones de 100 μ M. Se siguió el protocolo descrito anteriormente para registros de célula completa y se efectuaron mediciones de las corrientes evocadas por 100 μ M de glicina desde el minuto 0 y cada 5 minutos hasta los 20 minutos. Se mantuvo el potencial de membrana en -60 mV y se analizaron únicamente los sellos cuya variación de este y el LIC no superara el 20% durante el experimento. Para finalizar se aplicaron corrientes saturantes de 1000 μ M de glicina durante 4 segundos. Las condiciones fueron RGly α 3L+GFP+sec8 y como controles negativos RGly α 3L+GFP+sec8(desnaturalizado; 5 minutos a 100°C) y RGly+GFP (Figura 9).

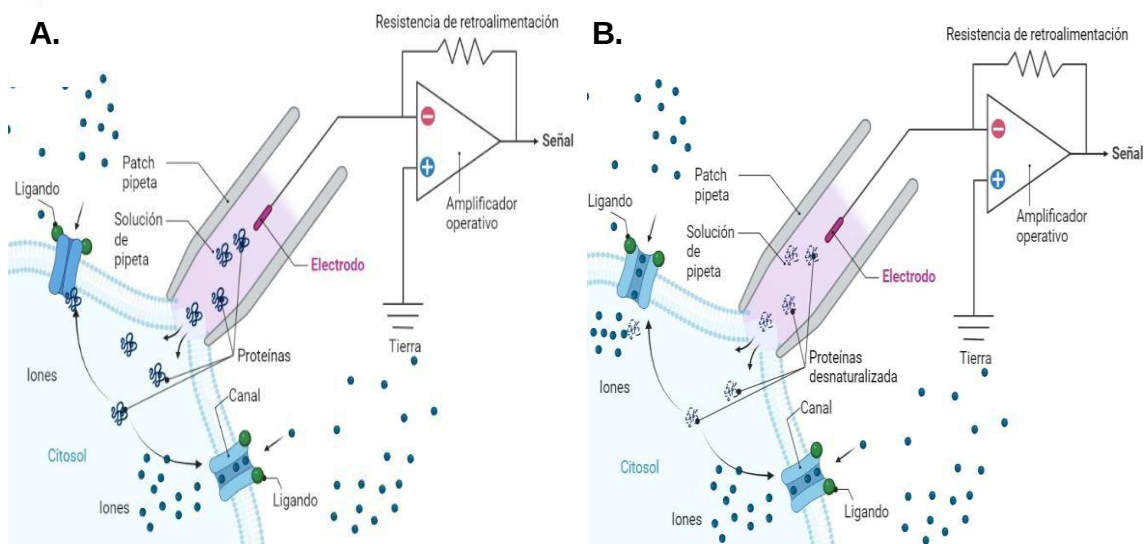


Figura 9. Esquema de técnica de patch clamp con perfusión de proteína intracelular: A) se observa el esquema de la técnica patch clamp célula completa con proteína añadida en la solución de pipeta para ser perfundida al interior de la célula, B) también se observa la técnica de célula completa y perfusión intracelular de proteína, pero esta vez con la proteína desnaturalizada.

6.6 Estructura del dominio intracelular del receptor de glicina $\alpha 3$

Se modeló la estructura del ICD del GlyR $\alpha 3$ L utilizando el servidor de inteligencia artificial Alpha Fold 2 v1.5.3 con la secuencia de aminoácidos del ICD (RQHKELLRFRRKRKNKTEAFALKFYRFSDMDDEVRESRFSFTAYGMGPCLQAKDGMTPKGPVQVMPKSPDEMRKVFIDRAKKIDTISR) obtenida en la base de datos de Uniprot (O75311) y 5 veces la secuencia para formar el pentámero. Se ajustaron dos tipos de parámetros el primero consta de:

num_relax 1; Template_mode none; single_sequence; unpaired_paired;
Model_type alphafold2_multimer_v3; num_recycles 6;
recycle_early_stop_tolerance auto; relax_max_iterations 200; pairing_strategy
greedy; max_msa auto; num_seeds y dpi 200. En el segundo conjunto de
parámetros se cambió el msa_mode de single_sequence a
mmseqs2_uniref_env. Para el modelo del ICD del GlyR α 3K se usó el mismo
protocolo en la IA usando la siguiente secuencia de aminoácidos del
ICD (RQHKELLRFRRKRKNKDDEVRESRFSFTAYGMGPCLQAKDGMTPKGP
NHPVQVMPKSPDEMRKVFIDRAKKIDTISR) obtenida en Uniprot (O75311)
(Jumper et al., 2021).



6.7 Estructura de la proteína del complejo de exocitosis sec8

La estructura de la subunidad del complejo de exocitosis sec8 fue obtenida de la base de datos Uniprot (Q96A65). En dicha base, se encuentran tanto la estructura por rayos X desde los aminoácidos 965 al 974 de la cadena, como la estructura predicha por AlphaFold, que abarca desde el aminoácido 1 al 974. Esta última presenta un alto grado de fidelidad y abarca la secuencia completa de la subunidad.

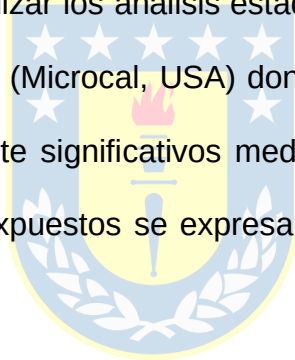
6.8 Docking proteína-proteína

El docking proteína-proteína se llevó a cabo utilizando el servidor Cluspro, perteneciente al laboratorio VAJDA de la Universidad de Boston. Se emplearon tanto las estructuras en formato PDB de ICDGlyRα3L y K, generadas mediante inteligencia artificial, en un docking rígido con la estructura en formato PDB de la subunidad sec8. Cluspro realiza tres pasos de análisis computacional: 1) Docking rígido, 2) Clustering basado en la desviación cuadrática media (RMSD) de las 1000 estructuras de menor energía, con los clusters más grandes que contienen los modelos más probables del complejo, y 3) Refinamiento de las estructuras seleccionadas mediante la minimización de la energía.

El paso de docking de cuerpo rígido utiliza PIPER ($E = w_1 E_{representante} + w_2 E_{Attr} + w_3 E_{Elec} + w_4 E_{DARS}$), que emplea el acoplamiento basado en la transformación rápida de Fourier (FFT), dando como resultado un ranking de los diez mejores modelos para cada conjunto de modelos, los cuales se dividen en equilibrados, favorecidos por electrostática, favorecidos por hidrofobicidad y van der Waals + electrostática (Kozakov et al., 2017).

6.9 Análisis de estadísticas

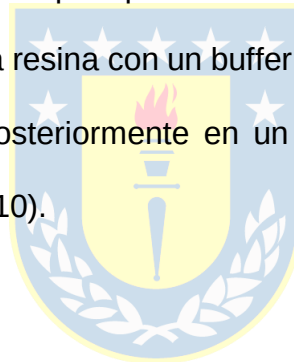
El análisis de co-localización fue realizado a través del análisis off-line de las imágenes de inmunocitoquímica obtenidas mediante microscopía confocal usando el programa FIJI y el protocolo de estadística JaCob para coeficientes de Pearson. En la determinación por coprecipitación de la interacción de sec8 y ICDRGly α 3 se consideró 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 se expresaron como el promedio $\pm$ error estándar.



7 RESULTADOS

7.1 Análisis de la interacción de la proteína del complejo de exocitosis sec8 con el dominio intracelular del receptor de glicina $\alpha 3L$ mediante ensayos pull down

Para investigar la interacción directa entre ambas proteínas, se realizaron ensayos de pulldown utilizando la proteína Sec8-FLAG y el ICDRGly $\alpha 3L$ -His fusionado a GST. Ambas proteínas se coexpresaron en bacterias *E. coli* BL21; luego, las células fueron lisadas. El lisado se incubó en una columna de glutatión durante 24 horas para permitir la precipitación del lisado por la columna (fracción sin retener) y luego se trató la resina con un buffer de lavado y elución. Todas las fracciones se visualizaron posteriormente en un western blot con anticuerpos anti-FLAG y anti-His (Figura 10).



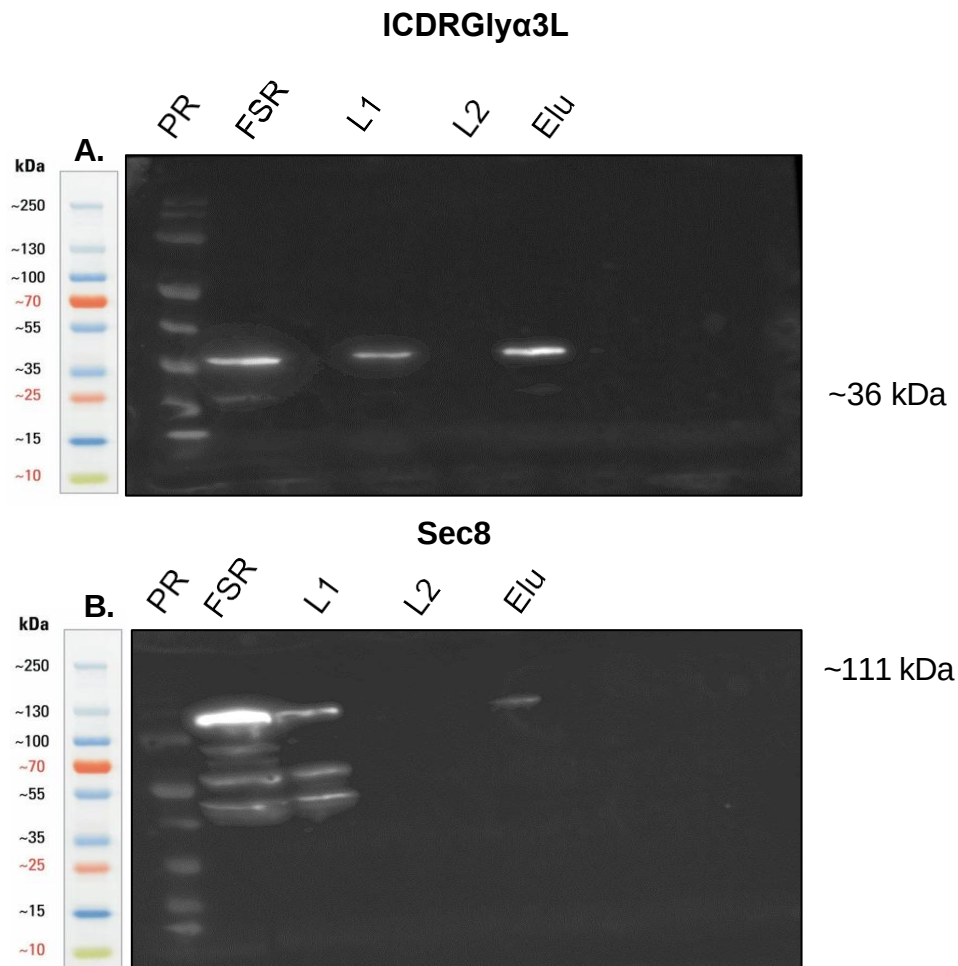


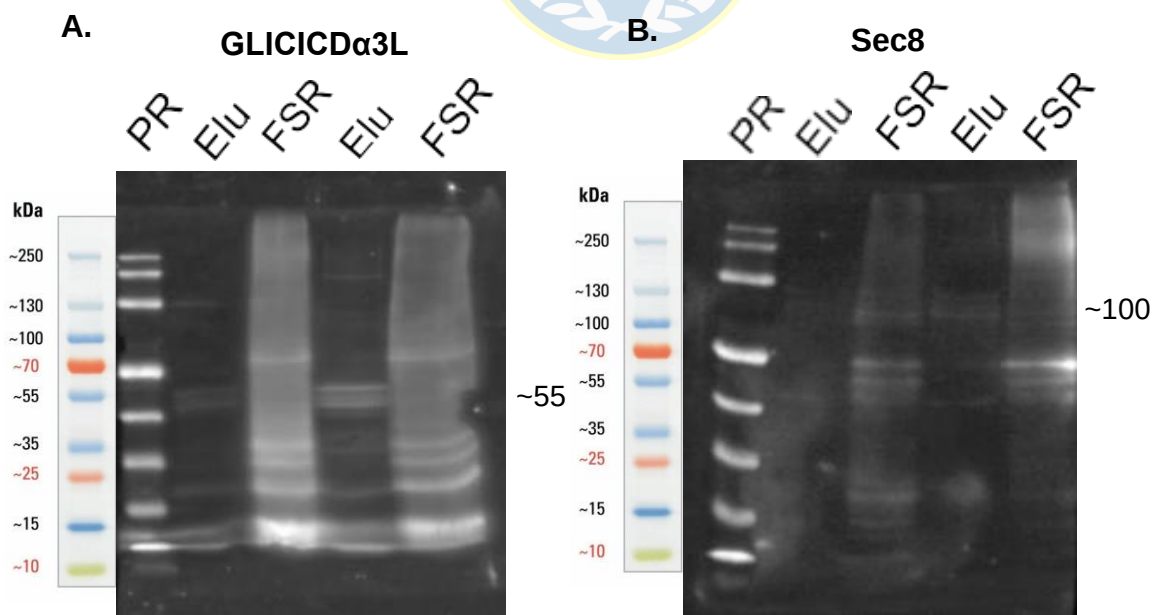
Figura 10. Análisis Western blot de coprecipitación de las proteínas Sec8-FLAG y el ICDRGly α 3L-His: A) membrana tratada con anticuerpo anti-his dividida en 4 fracciones FSR; L1; L2 y Elu. B) membrana tratada con anticuerpo anti-flag dividida en 4 fracciones FSR; L1; L2 y Elu.

La figura 10 nos muestra en A) un western blot dividido en 4 carriles (fracción sin retención (FSR), lavado 1 (L1), lavado 2 (L2) y elución (Elu)). Se observan bandas asociadas al ICD α 3L ~36 kDa con anticuerpo anti-His en todas las fracciones. En la fracción sin retener y elución se puede observar una banda de menor peso igualmente con señal del anticuerpo, pero más débil. B) Western blot igualmente

dividido en 4 carriles donde se visualiza banda asociada a Sec8 ~111 kDa con anticuerpo anti-FLAG. Se puede visualizar igualmente bandas de menor peso tanto en la fracción sin retener como en la fracción de lavado 1; estas bandas muestran una señal más débil y desaparecen por completo en las fracciones de lavado 2 y elución. Las bandas visualizadas en el carril de la fracción de elución de ambos westerns blots presentan una señal clara y específica de coprecipitación de ambas proteínas.

Posteriormente, se decidió expresar en la cepa bacteriana BL21 el receptor quimérico GLICICD α 3L con el tag HA (hemaglutinina) junto con la proteína Sec8-His y analizar mediante un ensayo western blot con anticuerpos anti-HA y anti-His tanto el sobrenadante del lisado celular como el pellet, dividiendo así entre el sobrenadante que corresponde al citosol y el pellet que corresponde a la membrana. El sobrenadante fue lisado usando el protocolo descrito anteriormente, luego se incubó en una columna de Ni-NTA durante 24 horas, se precipitó el lisado del sobrenadante y luego se trató la resina con buffer de lavado y elución. Mientras que el pellet fue tratado con una solución detergente DDM al 2% en agitación durante 24 horas, centrifugado nuevamente e incubado en una columna de Ni-NTA; posteriormente, se precipitó y la resina se trató con buffer de lavado y elución. A) Se observan las señales asociadas a los anticuerpos anti-HA correspondientes a las fracciones de elución para el citosol (carril 1 y 3) para GLICICD α 3L-HA ~55 kDa y B) anti-His en los carriles para la membrana (carril 3) para Sec8-His ~111 kDa. La señal es más fuerte en la fracción que corresponde

a la muestra de membrana, mientras que los carriles 2 y 4 que corresponden a las fracciones sin retener no muestran claramente ninguna banda. Por otro lado, la banda correspondiente a Sec8-His se presenta con un peso molecular de 100 kDa, que es más bajo que el teórico. En C) se observa una membrana tratada con anti-his dividida 2 con 4 carriles cada división correspondiente a: Fracción sin retener (FSR); Lavado 1 (L1); Lavado 2 (L2); Elución de cuerpos de inclusión (Elu mem) o Elución de sobrenadante (Elu cito). Podemos localizar la señal correspondiente para Sec8 en los carriles FSR y L1 de ambas divisiones, pero solo podemos identificar la señal de Sec8 en el carril de Elu mem. En D) la misma membrana fue tratada con anticuerpo anti-HA obteniendo así señal de GLICICD α 3L en FSR y L1 para ambas divisiones, pero solo se presenta la señal en la fracción de elución de membrana (Elu mem) (Figura 11).



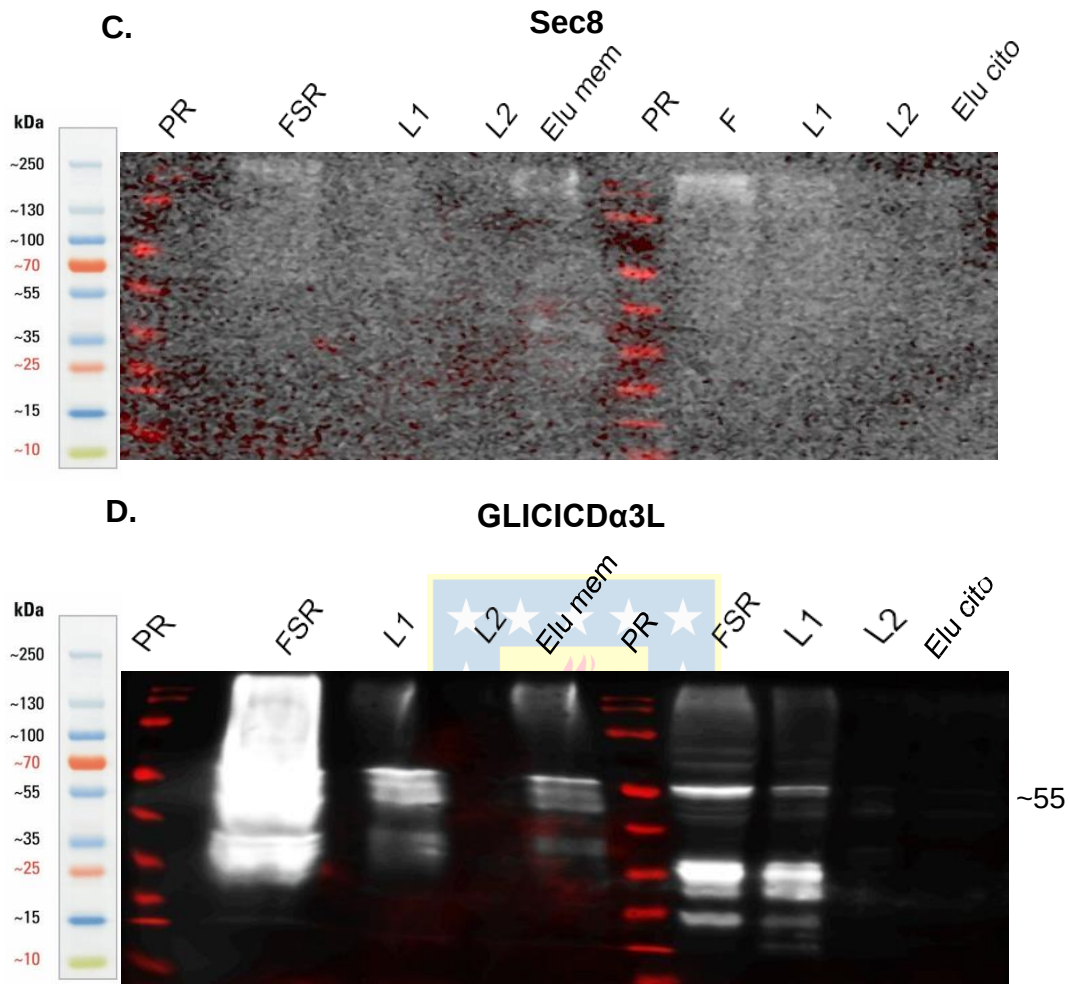


Figura 11. Análisis de ensayo His-pull down mediante western blot de las proteínas GLICICD α 3L-HA y Sec8-His: A) Membrana tratada con anticuerpo anti-HA con muestras de sobrenadante y membrana. B) Western blot con anticuerpo anti-his con muestras de sobrenadante y membrana. C) Western blot tratado con anticuerpo anti-his separado en 4 fracciones tanto para muestras de membrana a la izquierda como para muestras de citosol a la derecha. D) Western blot tratado con anticuerpo anti-HA separado en 4 fracciones tanto para muestras de membrana a la izquierda como para muestras de citosol a la derecha.

Finalmente, se expresó el receptor de glicina $\alpha 3L$ con GFP en células HEK293 como control de transfección. Posteriormente, las células fueron lisadas y se separó el sobrenadante del pellet al que se trató con solución detergente DDM al 2%. Al mismo tiempo, se obtuvo la proteína Sec8-His purificada de cultivos bacterianos. Ambas proteínas fueron sometidas a ensayos de pulldown en una columna con resina de Ni-NTA en las que se incubaron en conjunto para luego precipitar la fracción sin retener y tratar la resina con buffer de lavado y elución. Se analizó mediante western blot con anticuerpos anti-His y anti- $\alpha 3$ en dos membranas con las mismas muestras (Figura 12). A) En este ensayo de western blot, igualmente se advierte una señal débil del anticuerpo anti- $\alpha 3$ de la banda correspondiente a la proteína de la subunidad $\alpha 3L$ ~50 kDa. Además, se visualizan bandas y señal más fuertes en las fracciones sin retener y lavado 1 que desaparecen en la fracción de lavado 2. B) Se presenta un western blot dividido en cuatro fracciones en el que se observa una señal débil del anticuerpo anti-His para la proteína Sec8 en la fracción de elución. Se observan también bandas claras correspondientes a la proteína en las fracciones sin retener y lavado 1; esta desaparece en el lavado 2. En conjunto, ambos ensayos indican la coprecipitación de ambas proteínas, debido a la presencia de la señal de los anticuerpos en la fracción de elución. C) Se observa un western blot donde se observa la señal débil del anticuerpo anti-His y la banda correspondiente a Sec8 en la fracción de elución, también que la proteína no corrió en el gel SDS estancándose en la parte superior.

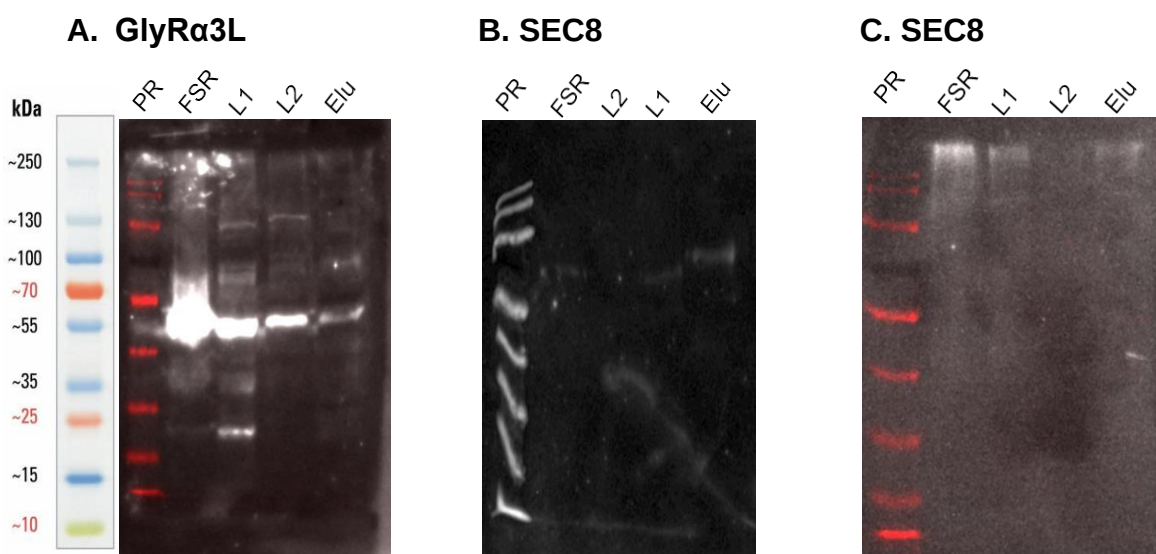


Figura 12. Análisis de ensayo His-pull down mediante western blot con las proteínas sec8 purificada en bacterias y GlyRα3L en HEK293: Se observa en A) western blot tratado con anticuerpo anti-α3 dividido en 4 fracciones. B) membrana tratada con anticuerpo anti-his y C) Igualmente tratada con anticuerpo anti-his y divididas en las 4 fracciones correspondientes.

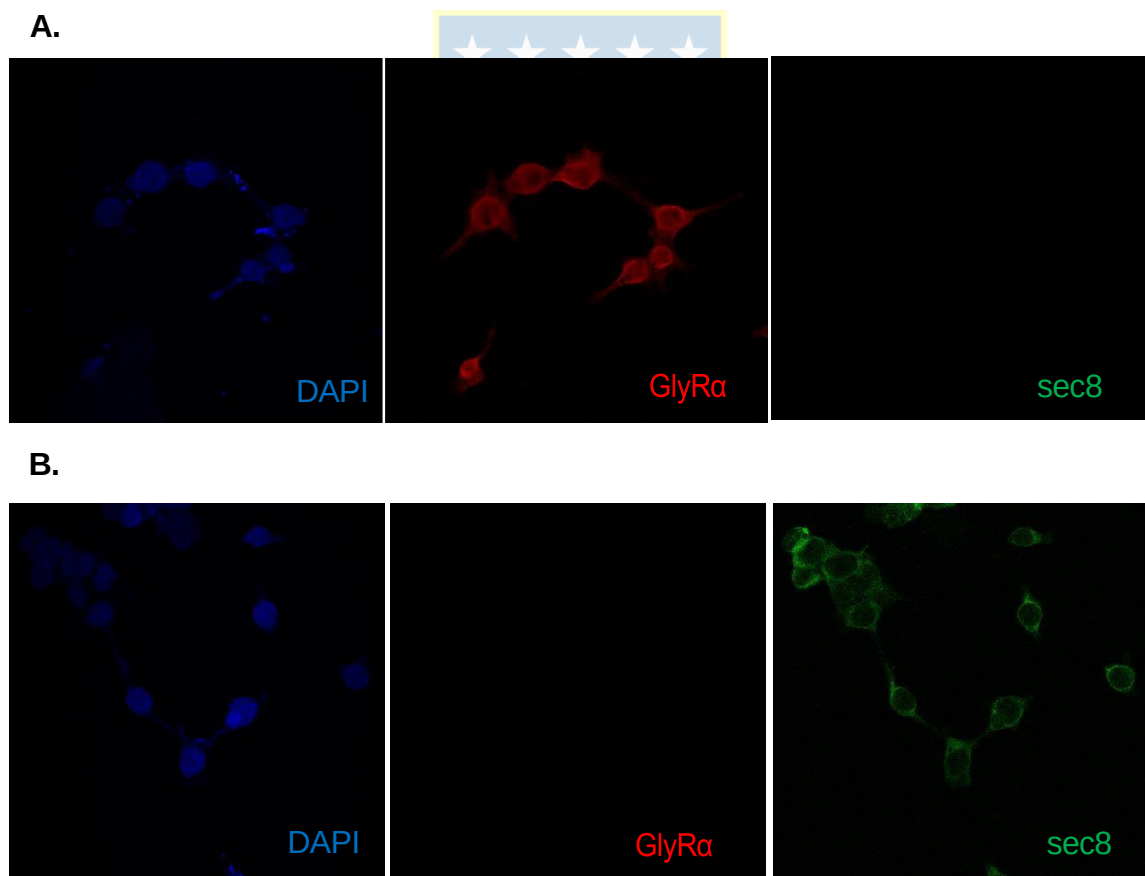
El conjunto de resultados obtenidos a través de las distintas condiciones para los ensayos pulldown indican una interacción específica entre la proteína Sec8 y el ICD del GlyRα3L debido a la coprecipitación de Sec8 con el ICDα3L y GLICICDα3L. Finalmente, la coprecipitación de GlyRα3L con Sec8 implica que esta interacción puede suceder en receptores funcionales a través de su dominio intracelular, incluso en la membrana celular. Es decir, la interacción entre ambas proteínas no requiere la subunidad completa del receptor para ocurrir, pero cuando se expresa el ICDα3L en un receptor quimérico (GLICICDα3L, funcional) o se expresa el GlyRα3L (funcional) y luego se realiza el ensayo pulldown con

ambas proteínas, la proteína Sec8 muestra señales más fuertes en las fracciones correspondientes a la membrana celular.

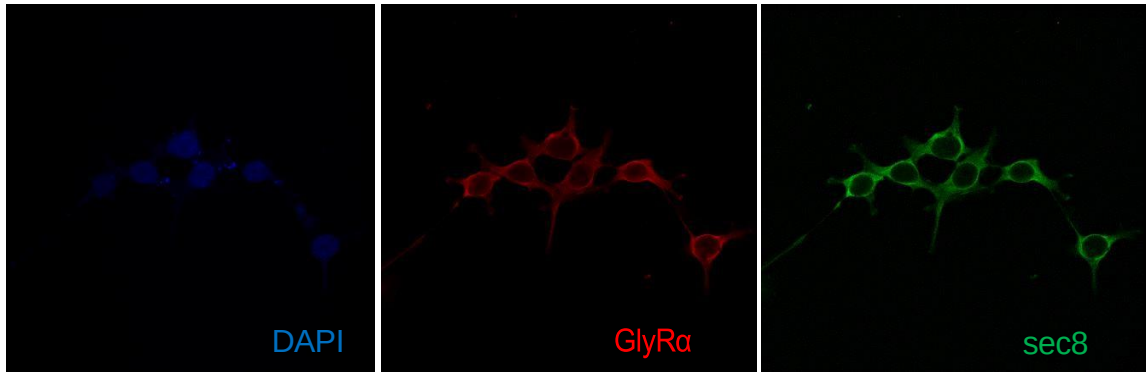
7.2 Estudios de colocación de sec8 con las subunidades $\alpha 3L$ del receptor de glicina mediante inmunocitoquímica en células HEK293

Se expresó GlyR $\alpha 3L$ y Sec8 por separado en células HEK293 como control para inmunocitoquímica con anticuerpo secundario Cy3 (rojo) y FITC (verde), respectivamente. Al mismo tiempo, se coexpresó la proteína Sec8 con las subunidades GlyR $\alpha 3L$ en células HEK293 para evaluar su colocación mediante protocolos de inmunocitoquímica. En la Figura 13, se observa mediante las señales de fluorescencia la expresión de ambas proteínas por separado, y a continuación, se observan las señales de cada proteína al ser coexpresadas. Por otro lado, observamos la superposición de ambos canales y la colocación mediante la visualización del color amarillo. De igual manera, en B, observamos los parámetros obtenidos para el coeficiente de Pearson, M1 y M2 mediante los gráficos (Figura 13). En A) observamos en el primer cuadro de la izquierda el canal azul que marca los núcleos celulares con DAPI. En el recuadro central, la expresión de GlyR $\alpha 3L$ en canal rojo, y en el recuadro derecho se observa el canal rojo sin señal de expresión. B) En la siguiente fila se observa en el primer recuadro a la izquierda el canal azul que corresponde a DAPI. En el recuadro central, se observa el canal rojo sin señal. En el recuadro de la derecha, se observa la expresión de la proteína Sec8 en las células mediante el canal verde.

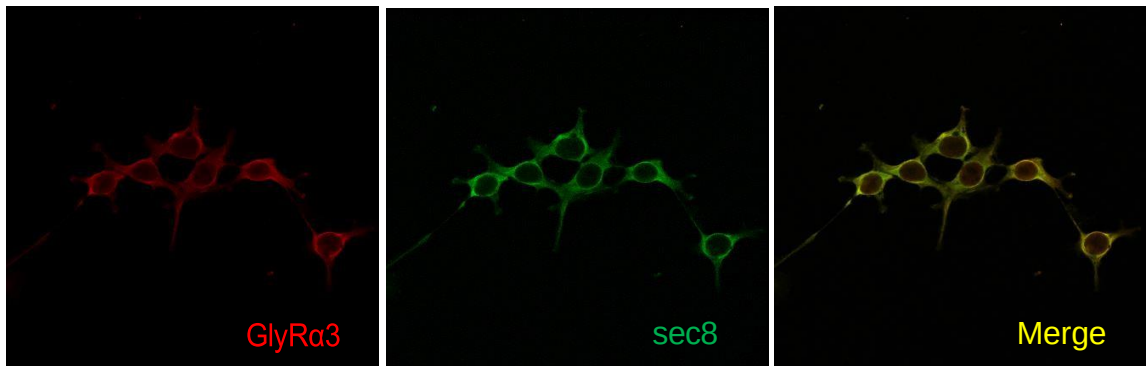
C) Tenemos células que coexpresan ambas proteínas. Se observa en el recuadro izquierdo canal azul de DAPI, en el recuadro central canal rojo que muestra la expresión de GlyR α 3L y en el recuadro derecho se expresa Sec8 en verde. D) Se observan en verde la señal correspondiente a Sec8 y en rojo la señal que corresponde a la expresión del receptor. En el último recuadro de la derecha, se observa la superposición de los canales verde y rojo (Merge, amarillo). E) Gráfico con los parámetros de colocación de Pearson y Manders obteniendo los siguientes coeficientes P(0,95267), M1(0,977), y M2(0,85067).



C.



D.



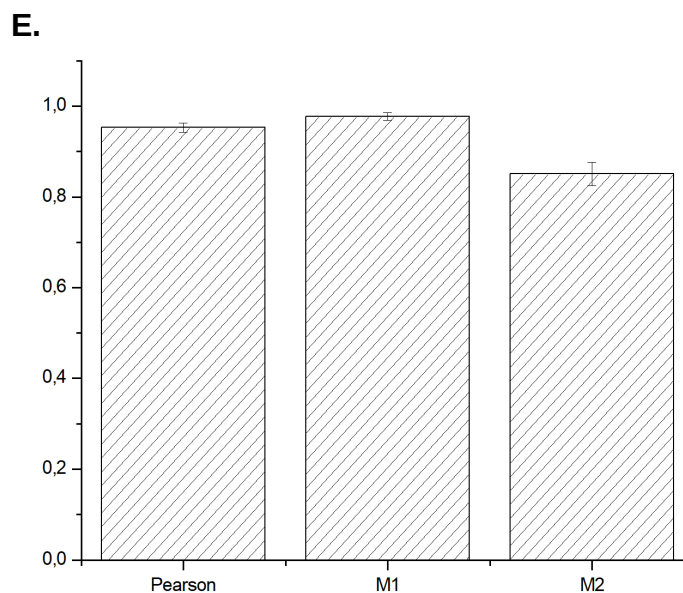


Figura 13. Inmunocitoquímica para colocalización entre GlyR α 3 (rojo) y sec8 (Verde): A) Células HEK293 que expresa GlyR α 3 visualizadas con el canal rojo. En B) se observan células HEK293 que expresan sec8 visualizadas usando el canal verde. C) Muestra células HEK293 que coexpresan RGly α 3L y Sec8 visualizadas por separado en canal rojo para RGly α 3L y Sec8 mediante el canal verde. En D) se observa las células que coexpresan ambas proteínas y la superposición de ambos canales (Rojo y verde). E) Grafica los coeficientes de Pearson y Manders obtenidos de la superposición de canales y la colocalización de ambas proteínas.

Posteriormente, debido al coeficiente de Pearson tan elevado obtenido, se decidió cambiar los anticuerpos primarios y el color de la fluorescencia expresado para cada proteína, teniendo de esta manera el GlyR α 3L con el color verde (FITC) y Sec8 en color rojo (Cy3). Se realizaron controles en los que no se aplicó anticuerpo primario y/o se aplicó los anticuerpos de forma cruzada; en ambos

casos, no se obtuvo señal en los canales verde y rojo. Luego, se prosiguió el protocolo de inmunocitoquímica pudiendo visualizar los resultados en la siguiente Figura 14.

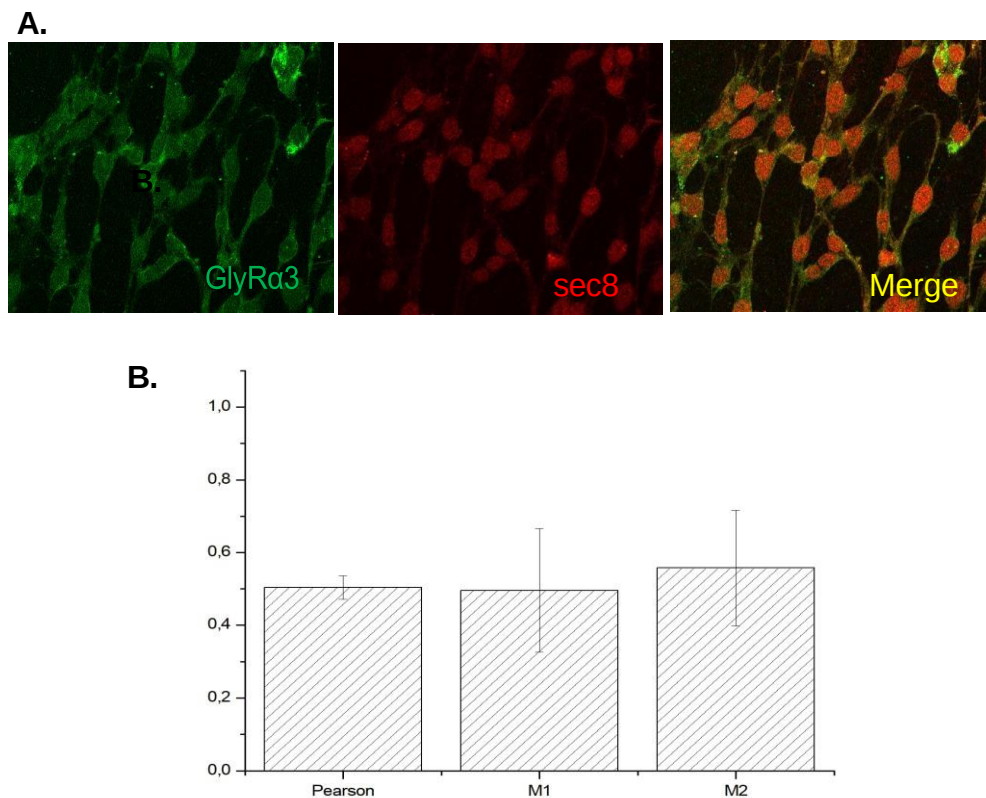
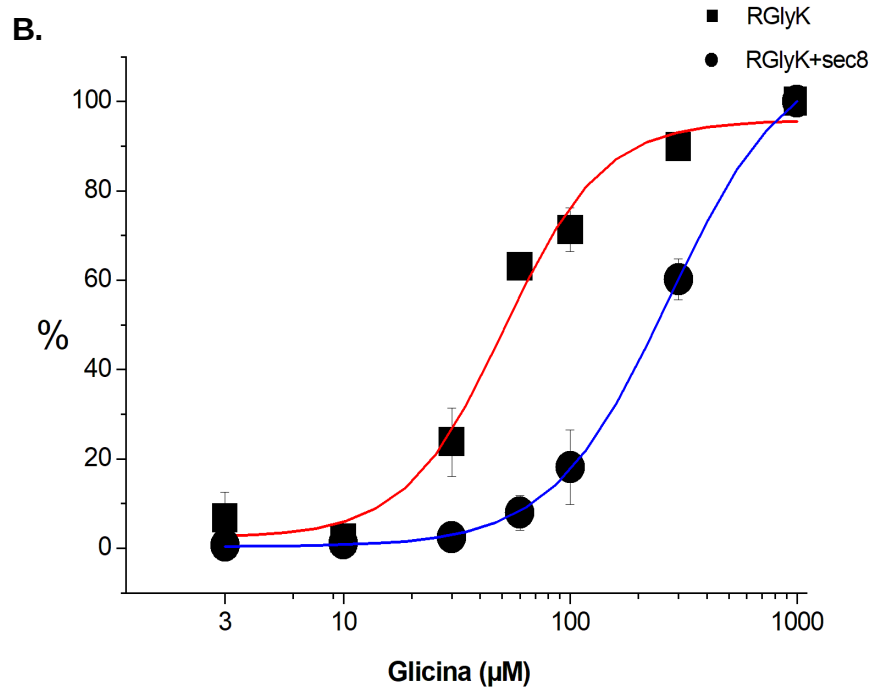
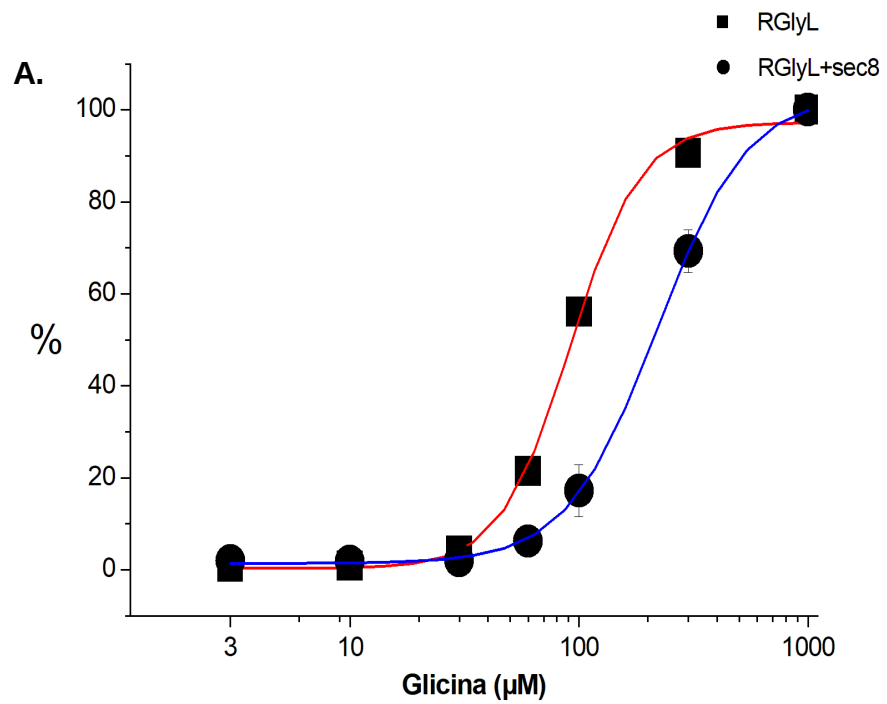


Figura 14. Inmunocitoquímica para colocalización entre GlyR α 3 (verde) y sec8 (rojo): A) Observamos en el recuadro de la izquierda la expresión del GlyR α 3L con el canal verde, en el recuadro central observamos la expresión de Sec8 en el canal rojo de las células HEK293. Finalmente, en el recuadro de la derecha se observa la superposición de ambos canales (Merge, amarillo). B) Cuantificación del índice de colocalización basado en los parámetros de Pearson 0,504 y Manders (M1: 0,496 y M2: 0,55775).

7.3 Estudio mediante técnicas de electrofisiología de la interacción del GlyR α 3 y la proteína del complejo de exocitosis sec8 sobre expresada en células HEK293

Para estudiar la posible modulación de GlyR α 3 por sec8, se realizaron experimentos de patch clamp en modalidad célula completa en cultivos de células HEK293 co-transfectadas con GlyR α 3 y sec8 o GFP para ambas variantes del receptor (α 3L y α 3K). Se realizaron registros de las corrientes glicinérgicas evocadas por glicina en distintas concentraciones (3-1000 μ M) para generar curvas concentración respuesta y evaluar diferentes parámetros en ambas condiciones (Figura 15).





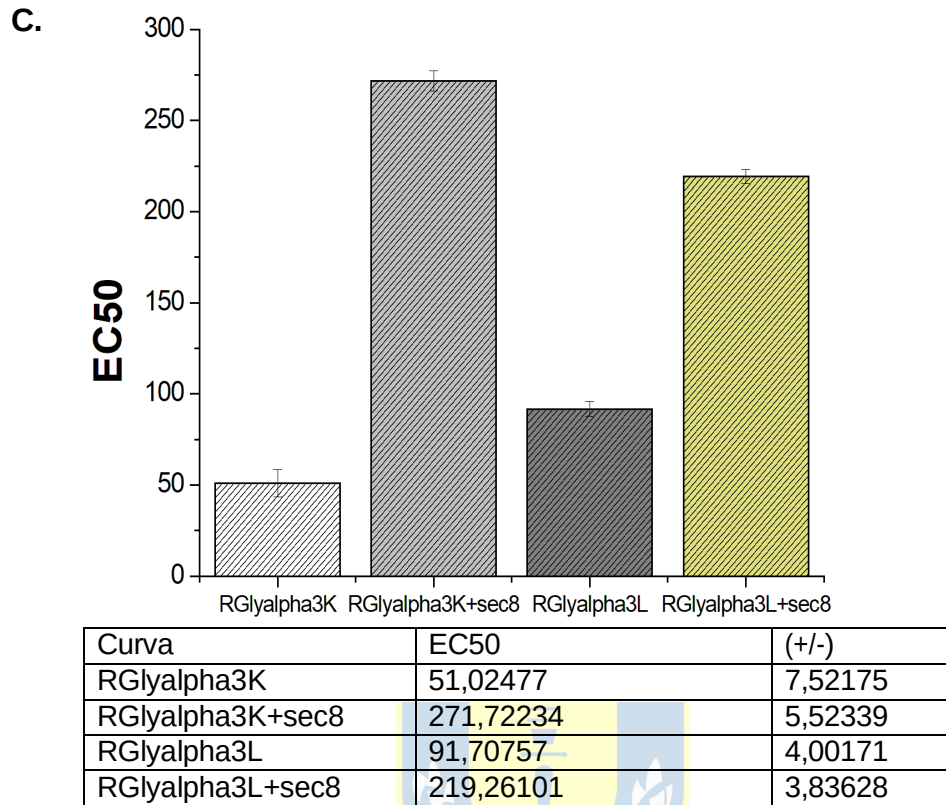


Figura 15. Curvas Dosis Respuesta del GlyRa3 y GlyRa3 coexpresado con sec8: En A) se observa la curva dosis respuesta correspondiente a la variante $\alpha 3L$ del receptor, en rojo la curva al ser expresado el receptor en solitario y en azul al coexpresar con sec8. Para B) se observa la curva dosis respuesta para la variante αK , en rojo la expresión en solitario del receptor y en azul al coexpresar ambas proteínas. En C) se presenta tanto el grafico de las EC50 de cada curva y su respectiva tabla.

A partir de los análisis estadísticos de la figura 15 podemos observar una diferencia significativa en las curvas de concentración respuesta y EC50 entre las células coexpresadas con sec8 y su control siendo 51,02 y 271,72

(RGly α 3K y RGly α 3K+sec8); 91,70 y 219,26 (RGly α 3L y RGly α 3L+sec8).
Ademas notar como no hay corrientes evocadas a bajas concentraciones de glicina al ser expresado el receptor de glicina α 3 y la proteina sec8 (Figura 16).

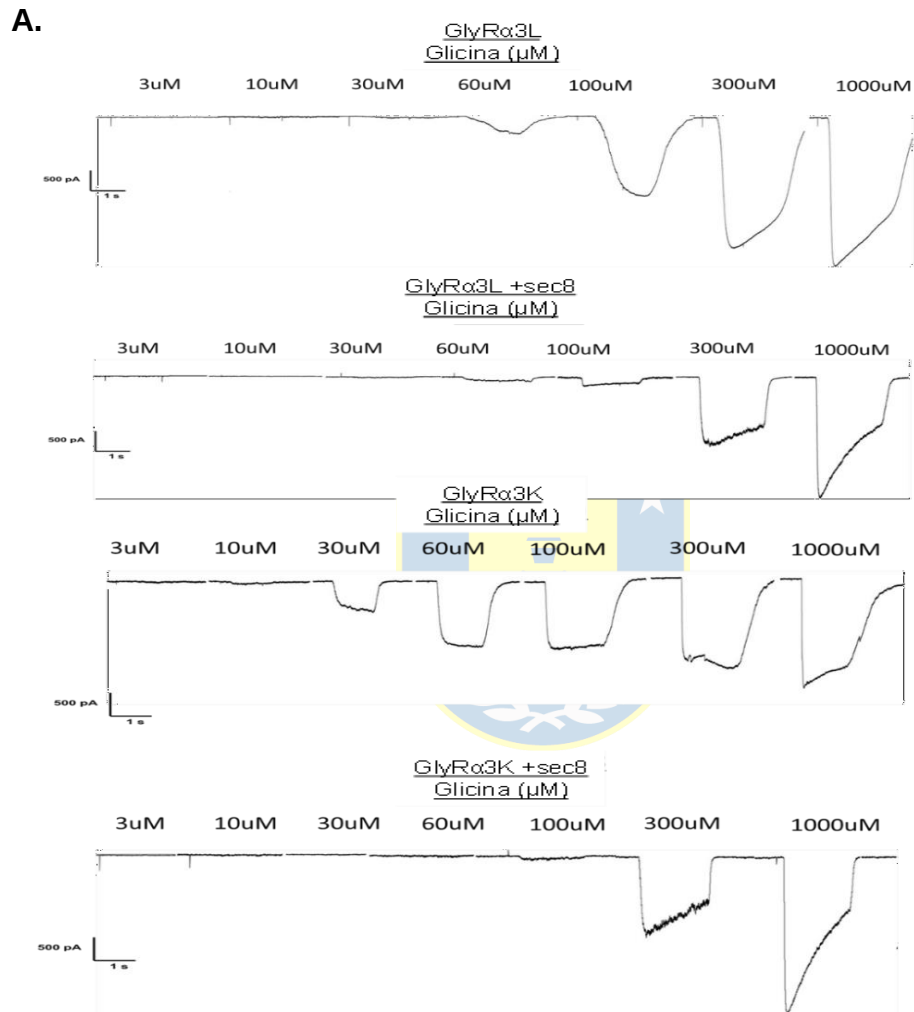


Figura 16. Corrientes evocadas por distintas concentraciones de glicina: Se observa en A) las corrientes evocadas por distintas concentraciones de glicina para cada una de las condiciones experimentales que van de concentraciones de 3 μ M de glicina a 1000 μ M.

La comparación de EC50 de ambas variantes del receptor en condiciones de coexpresión con sec8 y su control resultaron en EC50 α 3L vs EC50 α 3L+sec8 (91,70 y 219,26) y EC50 α 3K vs α 3K+sec8 (51,02 y 271,72). Observando una diferencia significativa para este parámetro. También se calculó el promedio de corrientes máximas obtenidas de ambas variantes en las dos condiciones resultado en una I_{max} α 3L vs I_{max} α 3L+sec8 y I_{max} α 3K vs I_{max} α 3K+sec8, no se observó una diferencia significativa entre las corrientes máximas (Figura 17).



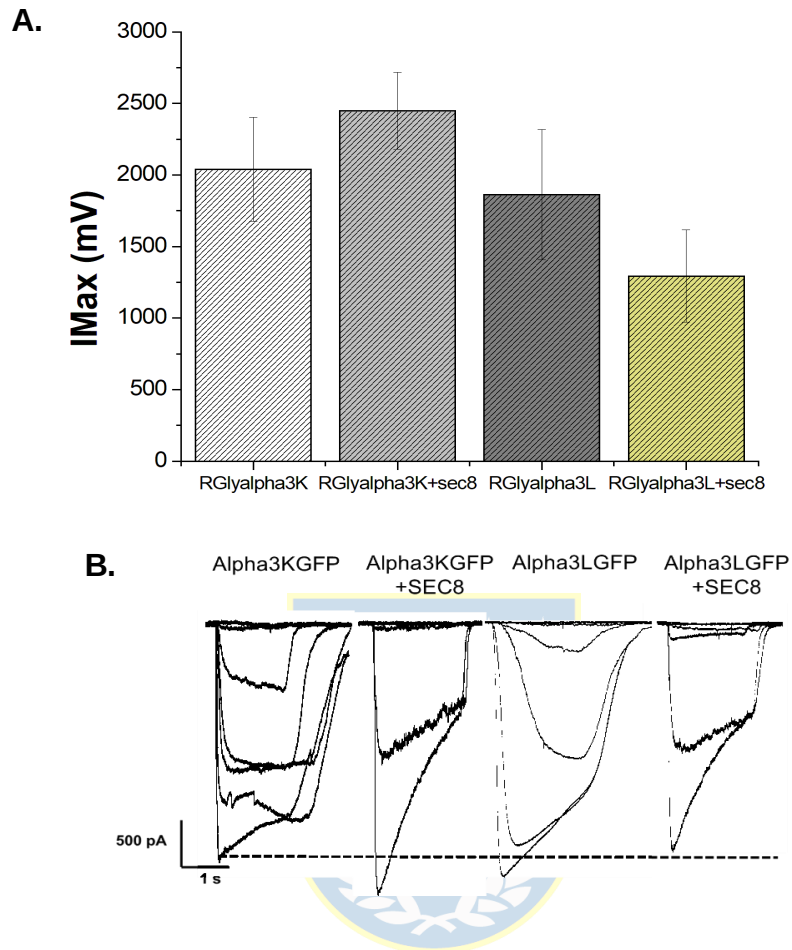


Figura 17. Gráfico IMax y corrientes máximas evocadas por glicina: se observa en A) las columnas del grafico correspondientes a las corrientes máximas de cada condición experimental y en B) se observan las corrientes evocadas por cada concentración de glicina destacando las concentraciones de 1000 μ M que provocaron las corrientes máximas.

A continuación, se observa en la figura 16 un cambio en la desensibilización del receptor a concentraciones de 1000 μM de glicina en las células HEK293 cotransfectadas con RGly α 3-GFP y sec8.

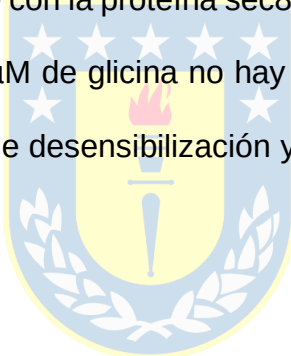
Las diferencias de EC50 para ambas variantes muestran una desensibilización del RGly α 3 por su agonista de 51,02 a 271,72 en el EC50 para la variante K y de 91,70 a 219,26 para la variante L. Mientras que el promedio de las corrientes máximas no presento una diferencia significativa indicando que la pérdida de sensibilidad a la agonista mostrada por las EC50 no se debe a la endocitosis del receptor debido a la interacción, si no que esta obedece a un posible cambio en el equilibrio del estado del mismo (Figura 17).

Con el objetivo de evaluar el comportamiento de RGly α 3L frente a la interacción con sec8 a lo largo del tiempo, se expresó el receptor en células HEK293. Se empleó proteína sec8 previamente purificada (con una concentración de 0.13 μM), la cual fue mezclada con la solución intracelular en una proporción de 100:500 μL y perfundida intracelularmente mediante la técnica de célula completa. Se aplicó glicina a una concentración de 100 μM cada 5 minutos mediante microperfusión externa, y se midieron las corrientes evocadas.

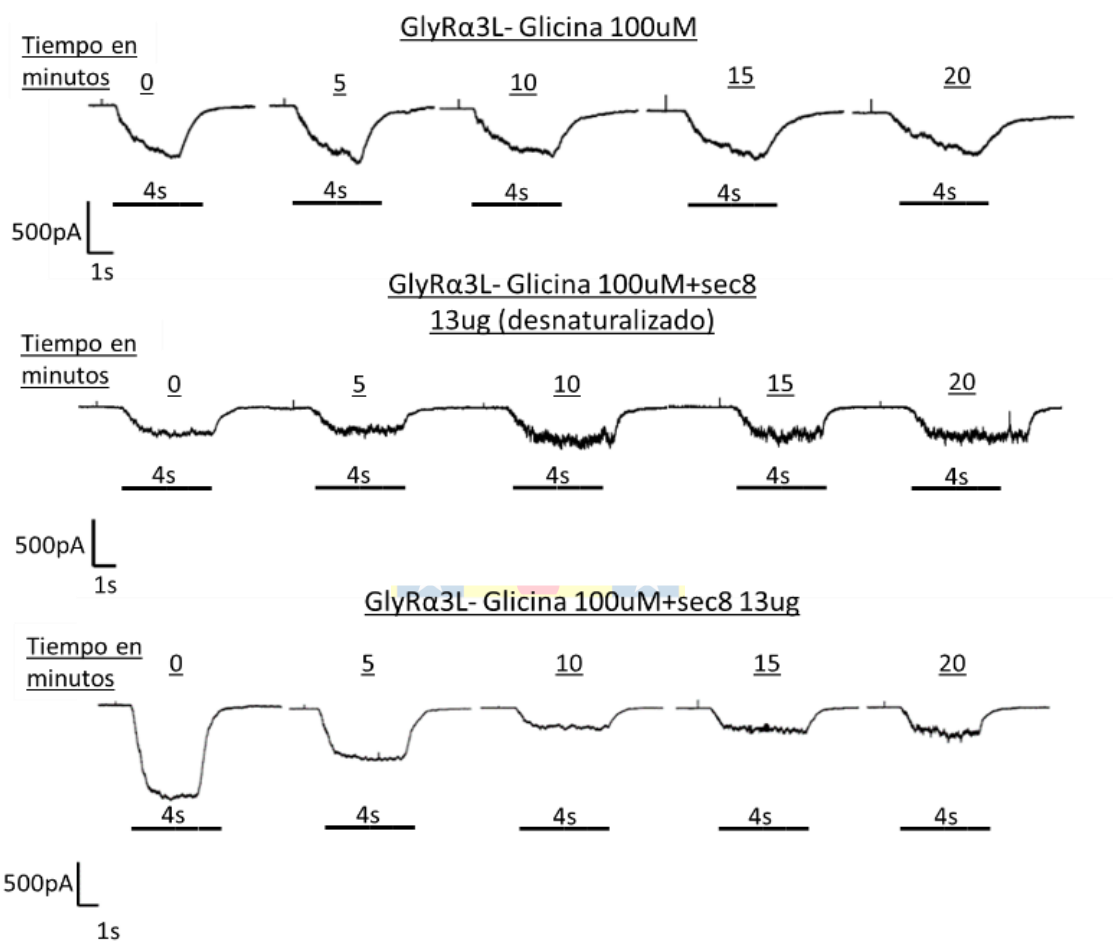
Como se ilustra en la Figura 18, se establecieron tres condiciones: un control sin sec8 en la solución, otra con sec8 desnaturalizado y la última con sec8 en su estado natural. Mientras que las dos primeras condiciones no mostraron

cambios significativos a lo largo de los 20 minutos, al perfundir la proteína sec8 en su estado natural se observó una disminución en la amplitud de las corrientes evocadas por glicina a 100 μM , aproximadamente del 50% a lo largo del experimento.

Adicionalmente, utilizando la misma metodología, se realizó la perfusión de glicina a una alta concentración de 1000 μM , se analizaron las corrientes evocadas y se midió el tiempo de desensibilización para cada condición. Se observó que el tiempo de desensibilización es menor cuando el receptor es perfundido intracelularmente con la proteína sec8. Adicionalmente al comparar las IMAX obtenidas a 1000 μM de glicina no hay diferencias significativas. Se observa la tabla de tiempo de desensibilización y grafico de IMAX en la figura 19.



A.



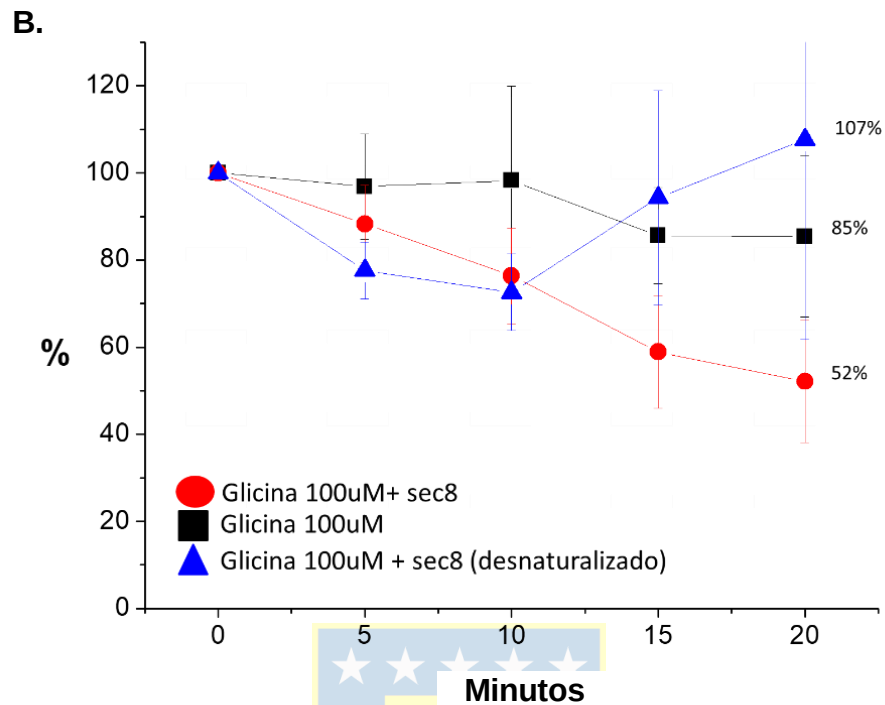


Figura 18. Corrientes y análisis de patch clamp célula completa con perfusión intracelular: En A) se observa la secuencia de las corrientes evocadas por 100 μ M de glicina en las tres condiciones experimentales, arriba sin proteína intracelular, en medio con la proteína desnaturalizada y finalmente con la proteína en estado natural. En B) tenemos el grafico de respuesta versus tiempo para cada una de las tres condiciones experimentales.

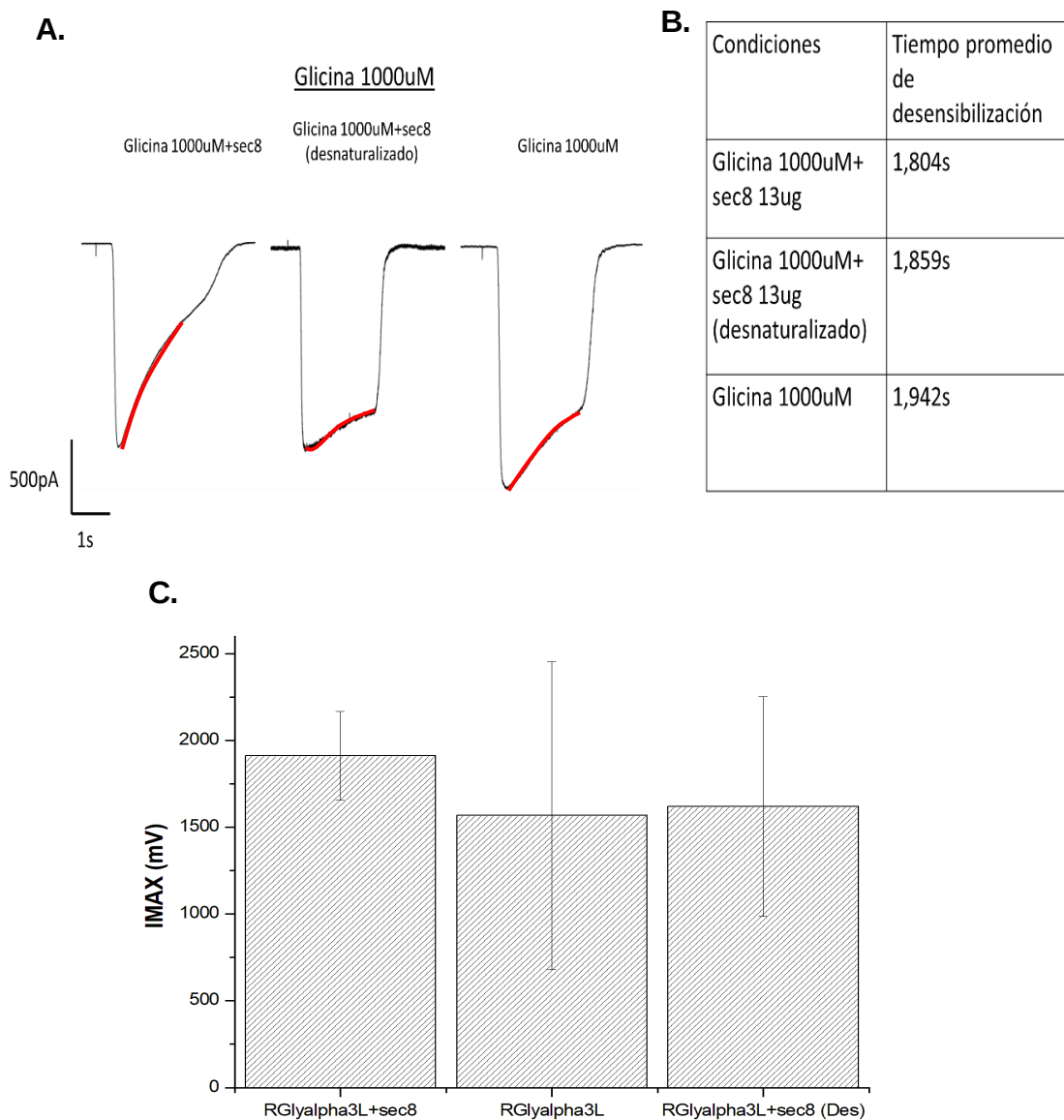


Figura 19. Desensibilización del RGly α 3L por corrientes evocadas de glicina 1000 μ M con perfusión intracelular: En A) se observan las corrientes evocadas por una alta concentración de glicina, en rojo su periodo de desensibilización. En B) los tiempos de desensibilización promedios obtenidos para cada condición. C) Grafico de comparación de las IMAX obtenidas con concentraciones de 1000 μ M de glicina.

Estos resultados sugieren que la interacción entre la proteína sec8 y RGly α 3L tiene lugar cuando sec8 se encuentra en su estado funcional, a diferencia de cuando está desnaturalizada. Además, tanto la forma de las corrientes evocadas por concentraciones altas de glicina como el tiempo de desensibilización medido indican que en presencia de sec8 en su estado natural, la interacción desplaza el equilibrio del estado del receptor hacia un estado desensibilizado.

7.4 Estudio in silico Docking proteína-proteína entre el ICDRGly α 3 y sec8

Para investigar las determinantes moleculares que median la interacción entre el ICDRGly α 3 y sec8 se decidió realizar un docking proteína-proteína con el fin de determinar los posibles residuos de la secuencia del ICDRGly α 3 que favorecen la interacción.

Debido a la falta de un modelo experimental de la estructura tridimensional del dominio intracelular del receptor de glicina α 3 es que se generó un modelo a partir de la secuencia del receptor encontrada en el banco de datos Uniprot utilizando alphafold2, se consideró solo la secuencia perteneciente al ICD para ambas variantes. Podemos observar en la figura 20 los modelos del ICD tanto para L como para K en su forma pentámero y de subunidad, así como los cristalogramas.

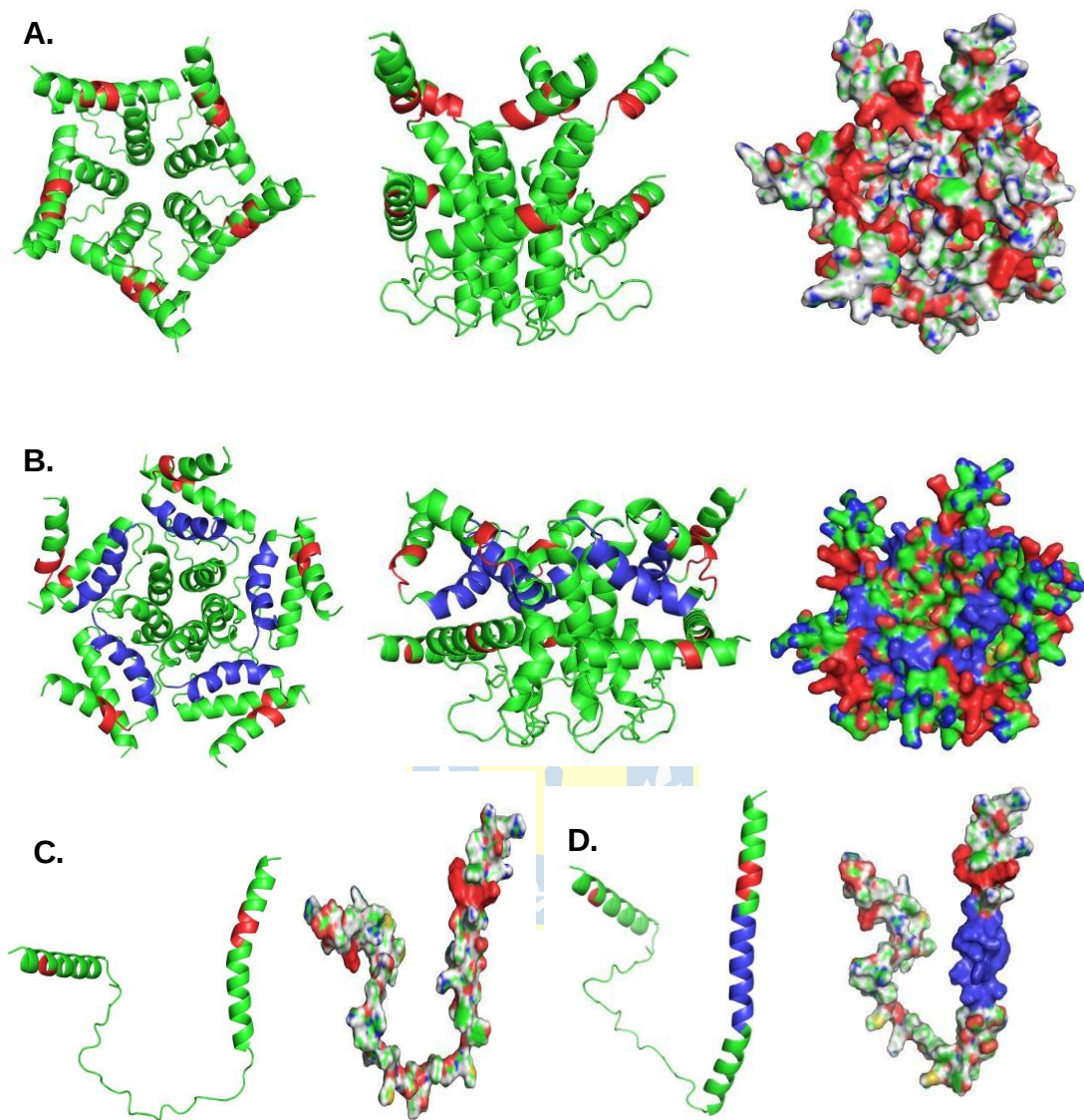


Figura 20. Estructuras del RGly α 3: En A) observamos el plano transversal y sagital de la estructura del ICD α 3K junto a su estructura en mesh. En B) tenemos la estructura en plano transversal y sagital de la estructura del ICD α 3L junto a su estructura en mesh. Por otro lado, en C) tenemos la estructura de la subunidad de ICD α 3K junto con su mesh y en D) la estructura de una subunidad ICD α 3L y su mesh correspondiente.

La estructura de sec8 tampoco contaba con un modelo experimental completo, pero si contaba con una estructura predicha en el banco de datos de Uniprot la cual se observa en la figura 21.

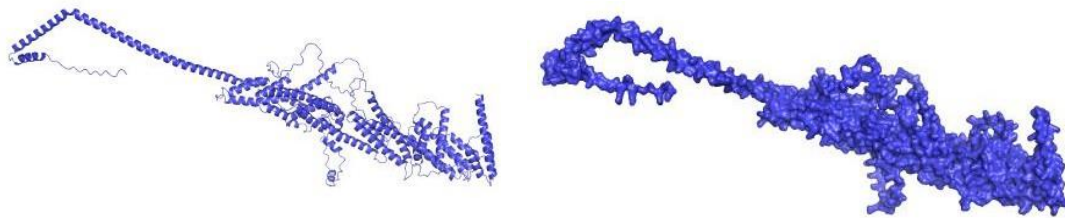
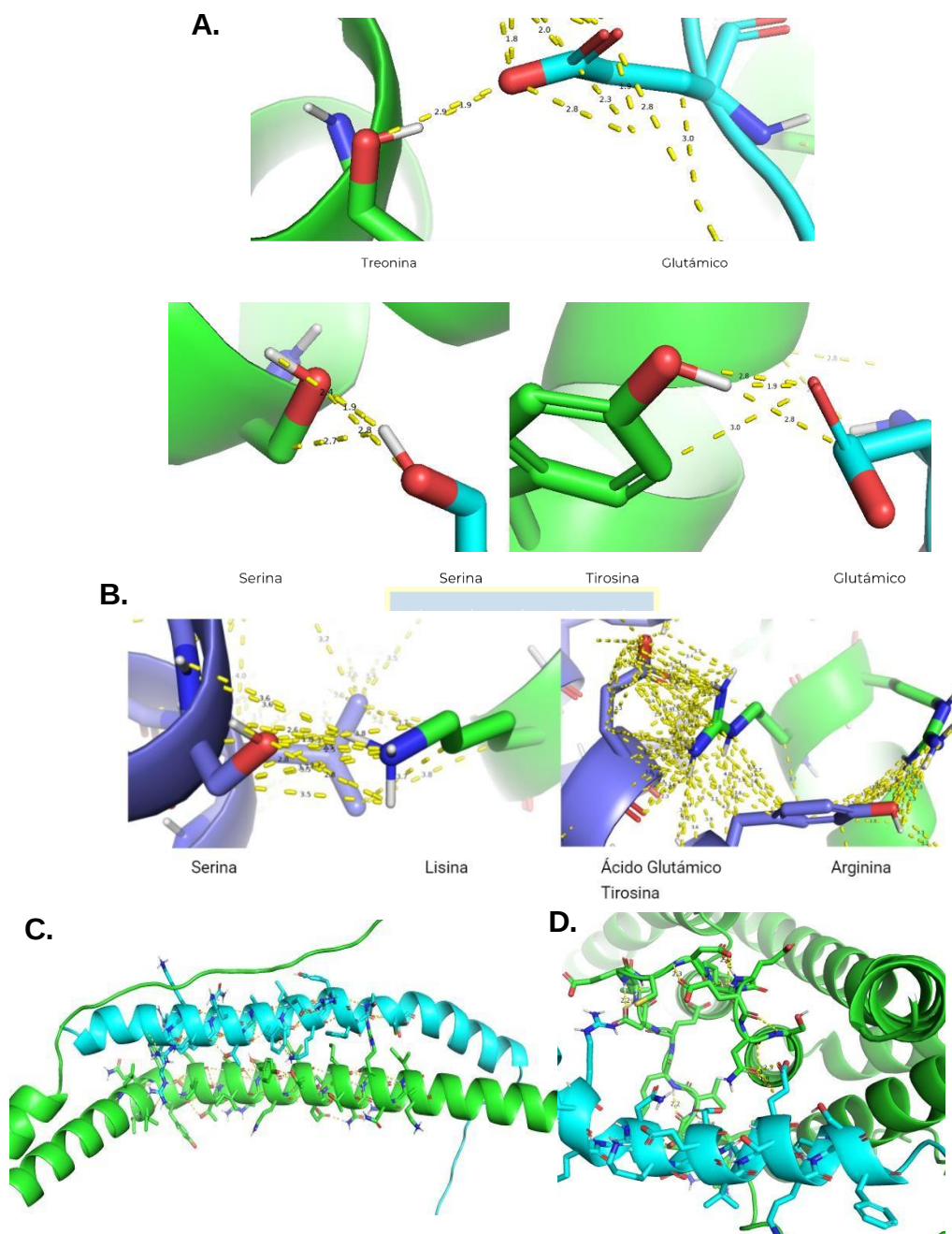


Figura 21. Estructura de la proteína del complejo de exocitosis sec8:
Estructura completa predicha mediante alphafold de la subunidad Sec8 del complejo de exocitosis.

A partir de ambas estructuras se realizó un docking proteína-proteína en el servidor de Cluspro. Podemos observar en la figura 22 este docking rígido nos proporcionó información sobre la energía de la interacción para ambas variantes del ICDRGly α 3 con sec8, así como la subunidad del ICD α 3 L y K con sec8.



E.

Variante del receptor	Cluster	Cluster subunidad	Weighted Score	Weighted Score de la subunidad
GlyR α 3L	35	37	-1031.3	-959.9
GlyR α 3K	78	53	-981.5	-929.7

Figura 22. Estructura del ICD α 3 y docking proteína-proteína: A) Podemos observar los residuos treonina, serina y tirosina exclusivos del ICD α 3L que interactúan con sec8 y en B) Los residuos comunes que interactúan con sec8. Mientras en C) se muestra el docking entre la subunidad del ICD α 3L y sec8 en D) la interacción entre la subunidad del ICD α 3K y sec8. Por otro lado, en E) se presenta la tabla con el número de aminoácidos participantes en el cluster principal para el ICD en pentámero y la subunidad, el weighted score de rango 1 equilibrado para el pentámero y la subunidad en cada variante.

Al recapitular los resultados obtenidos mediante el docking proteína-proteína observamos que la interacción entre ICD α 3L y sec8 se estabiliza principalmente por enlaces hidrógenos (fuerza electrostática dipolo-dipolo) proporcionados por los residuos que poseen en su cadena lateral grupos hidroxilos (Jeffrey & Saenger, 2012; Perrin & Nielson, 1997). No obstante, estos enlaces hidrogeno carecen de la fuerza de un enlace covalente o iónico. Por otro lado, observamos la diferencia de residuos participantes entre ambas isoformas del ICD, siendo que ICD α 3K dobla la cantidad de residuos participantes.

8 DISCUSIÓN

8.1 Análisis de la interacción de la proteína del complejo de exocitosis sec8 con el dominio intracelular del receptor de glicina $\alpha 3L$ mediante ensayos pull down

Los resultados de los procesos de expresión y purificación en bacterias *E. coli* BL21 para ICDRGly $\alpha 3$ -his y sec8-flag resultaron positivos según la detección mediante Western blot con anticuerpos anti-His y anti-Flag. Dado que esta posible interacción fue reportada anteriormente, nuestro objetivo inicial era confirmar la coprecipitación de ambas proteínas. Por lo tanto, no fue crucial estandarizar el rendimiento de las purificaciones de las proteínas de interés. En cambio, la prioridad fue generar la máxima cantidad de volumen de cultivo posible, la cual se fue ajustando y optimizando después de cada ensayo. A partir de los ensayos pudimos comprobar la coprecipitación de las proteínas y la disminución de señal en las bandas de elución indicarían que esta interacción ocurre de manera específica (Einarson et al., 2007; Kim & Hakoshima, 2019; Wissmueller et al., 2011).

En el caso de la expresión y purificación de GLICICD $\alpha 3$ -HA con sec8-his en bacterias BL21, también se obtuvieron resultados positivos mediante la detección de Western blot con anticuerpos anti-HA y anti-His, respectivamente.

Se utilizó un protocolo estandarizado de lisis y detergente DDM al 2% para la purificación, lo que permitió obtener señales claras en la detección por Western blot. Debido a la dificultad de no contar con una ultracentrífuga de fácil acceso, solo se pudo realizar una purificación utilizando este protocolo, de la cual se obtuvo una cantidad limitada de las proteínas para analizar mediante distintos ensayos pull down en columnas de Ni-NTA (Crowe et al., 1994; Lara et al., 2019; Nishtala et al., 2016). Igualmente, se separaron las purificaciones correspondientes para citosol y membrana con la intención de verificar la movilidad de la proteína sec8 con respecto a un receptor funcional de bacterias, efectivamente, se obtuvo una señal más fuerte del anti-his en la purificación correspondiente a membrana lo que indica la movilidad de sec8 hacia esta. Este método nos permitió, a diferencia del anterior, visualizar si esta interacción provoca el desplazamiento de una de las proteínas hacia una localización atípica dentro de un contexto celular funcional, debido a que el receptor GLIC1CD α 3 migra hacia la membrana. Por lo que la presencia de la señal de sec8 nos da indicios de la fuerza de interacción entre ambas proteínas.

Finalmente, se decidió purificar la proteína sec8 por separado en bacterias y utilizar células HEK293 para expresar RGly α 3 funcionales. Al igual que en el protocolo anterior, se separó la lisis entre membrana y citosol. La transfección en células HEK293 fue controlada mediante la fluorescencia de GFP, con una tasa de éxito aproximada del 40% (Ooi et al., 2016). Debido a la disponibilidad

de medio y a la línea celular, el volumen de cultivo de RGly α 3 fue notablemente inferior al volumen utilizado en la purificación de sec8. Esto repercutió directamente en el volumen final de la purificación de ambas proteínas y, especialmente, en la concentración. Aun así por medio de la concentración de las purificaciones en tubos amicon con filtros de 100kda (Johnsen et al., 2016), se obtuvieron resultados positivos mediante la detección por Western blot con anticuerpos anti-His y anti- α 3. Se observaron señales de los anticuerpos en las fracciones sin retener y lavado 1, pero las obtenidas en la fracción de elución para ambas proteínas, aunque presentes, se mostraban débiles, por otro lado, en cada ensayo mediante la observación se aprecia una diferencia en las señales de cada proteína, siendo más fuerte la señal en las bandas que corresponden al ICD α 3 y/o a la subunidad α 3L, lo que indica que la proteína sec8 podría estar interactuando con más de una subunidad del receptor de glicina α 3 y que a su vez se necesita utilizar una mayor cantidad de resina para atrapar a sec8 (Guzman et al., 2009; Moretto Zita et al., 2007; Wissmueller et al., 2011). Estos resultados muestran que si bien la interacción entre RGly α 3 y sec8 resulta altamente específica, esta sería débil dado que en la realización de los distintos ensayos se observa una disparidad en las bandas obtenidas además de una baja cantidad de coprecipitación de ambas proteínas (Vayanaperumal, 2023).

8.2 Estudios de colocación de sec8 con el receptor de glicina $\alpha 3$ mediante inmunocitoquímica en células HEK293

En nuestro primer estudio mediante inmunocitoquímica en células HEK293 se observó con claridad las señales fluorescentes correspondientes RGly $\alpha 3$ (canal rojo) y sec8 (canal verde). No se apreciaron visualmente cambios morfológicos en las células al expresar las proteínas por separado como controles o ambas juntas. Se observa que la intensidad de fluorescencia asociada a RGly $\alpha 3$ (rojo) es levemente mayor en el contorno celular esto debido a su rol como receptor en la membrana (Huang et al., 2007), mientras que la fluorescencia perteneciente a sec8 (verde) se presentaba más uniforme (Fais et al., 2021). Al realizar el análisis estadístico de colocación por coeficiente de Pearson y Manders estos arrojaron índices muy altos (Pearson 0,95267; M1 0,977; M2 0,85067) (Adler & Parmryd, 2010), y al observar las imágenes podíamos notar como al coexpresar ambas proteínas estas tenían un patrón de fluorescencia casi idéntico tanto para el canal rojo como el verde. Lo que al visualizar con ambos canales (merge) daba como resultado la presencia del color amarillo en gran parte de las células (Aaron et al., 2018). Este fenómeno puede deberse al tiempo de incubación luego de la transfección que para este caso fue de 22-24 horas debido a la migración de los receptores a la membrana o a problemas con la especificidad de los anticuerpos usados (Aaron et al., 2018).

Posteriormente se decidió cambiar los anticuerpos primarios cambiando así el color de fluorescencia para cada proteína, esta vez GlyR α 3 se expresó con fluorescencia verde y sec8 se expresó con fluorescencia roja, al analizar los canales por separado se observa que la expresión de GlyR α 3 es mayor en el contorno celular mientras que la expresión de sec8 es uniforme e incluso se puede visualizar la señal en los espacios donde se ubica el núcleo. Como forma de control en esta etapa se realizaron controles sin anticuerpo primario y también anticuerpos intercambiados, al aplicar el protocolo de inmunocitoquímica en estos no se obtuvieron resultados visibles. Lo que nos ayudó a corroborar la especificidad de los anticuerpos utilizados. Cabe destacar que estos estudios posteriores se incubaron de 18 a 20 horas después de la transfección. Luego se realizaron los análisis estadísticos que determinaron coeficientes de pearson y manders positivos (Aaron et al., 2018; Adler & Parmryd, 2010; Peeters, 2023). Cabe destacar que todos los estudios se realizaron con GlyR α 3 sin ningún epítopo y sec8-his8x y se utilizaron anticuerpos específicos para cada una (anti- α 3 y anti-his). Debido a las condiciones específicas del estudio no es factible extrapolar estos resultados al contexto neuronal. No obstante, nuestro sistema experimental demuestra la colocalización de ambas proteínas en células HEK293 de manera sólida. Para el futuro se hace imperativo realizar estos estudios en líneas celulares neuronales (Aaron et al., 2018; Winkelmann et al., 2014).

8.3 Estudio mediante técnicas de electrofisiología de la interacción del GlyR α 3 y la proteína del complejo de exocitosis sec8 sobre expresada en células HEK293

Bajo las condiciones experimentales los resultados mostraron que RGly α 3 en presencia de sec8 presenta cambios en su modulación por su agonista glicina. El desplazamiento de la curva dosis respuesta hacia la derecha muestra una clara desensibilización del receptor que se ve manifestada en la diferencia de EC50 entre la condición control y la que expresa la proteína sec8. Al no existir una diferencia significativa entre las corrientes máximas evocadas podemos deducir que la disminución de la respuesta del receptor no se debe a la endocitosis de este como ocurre en otras interacciones de receptores con componentes intracelulares como HUWE1 (Z.-Y. Zhang et al., 2019). Además, al analizar las corrientes evocadas por las concentraciones más altas de glicina se observa a simple vista un cambio en el proceso de desensibilización del receptor (Langlhofer et al., 2015; Langlhofer & Villmann, 2016).

Para obtener más pistas sobre el mecanismo de desensibilización es que se decidió introducir la proteína de forma exógena a través de la solución interna y la técnica de célula completa (Moraga Cid, 2009). Uno de los puntos más conflictivos de este protocolo es la variabilidad de la amplitud de las corrientes evocadas por glicina en RGly α 3 y la dependencia de estas en la estabilidad del sello y apertura formada en la técnica (Thomas & Smart, 2005), por lo que de todo el conjunto de mediciones realizadas para cada condición solo fueron

seleccionadas aquellas cuya resistencia del sello no tuviera una variación superior al 15% desde la medición inicial hasta el término del tiempo experimental, lo que redujo significativamente el número de datos y aumento considerablemente las barras de error. Así utilizando el mismo protocolo se usó concentraciones altas de glicina para visualizar el comportamiento del receptor al desensibilizarse, al observar las corrientes se pudo determinar con claridad que existía un cambio en el mecanismo de desensibilización del receptor, las mediciones de tiempo de desensibilización dieron como resultado un menor tiempo de desensibilización para el receptor al estar presente sec8 en estado natural. Estos resultados indicarían que existe un cambio en el equilibrio de estados del receptor, siendo este desplazado hacia un estado desensibilizado. Es decir, la interacción entre el ICDRGly α 3 y sec8 produce que el receptor favorezca el estado desensibilizado por sobre estado abierto (Yu et al., 2021). Además, es necesario replicar estos experimentos en un entorno de células neuronales para observar las posibles diferencias que podrían producirse en modulación del receptor (Kung et al., 2001).

8.4 Estudio in silico Docking proteína-proteína entre el ICDGlyR α 3 y sec8

El docking proteína-proteína mostro resultados congruentes con los reportes anteriores de la interacción entre sec8 y RGly α 3, Debido al panorama energético y la puntuación más baja se deduce que la conformación con más probabilidades corresponde a la establecida entre el pentámero de ICD α 3L y sec8. Al analizar las puntuaciones y panorama energético con los parámetros establecidos en el servidor también se pudo extrapolar que las conformaciones entre el sec8 con la subunidad del ICD α 3L, el pentámero del ICD α 3K y la subunidad ICD α 3K son menos probables, igualmente se establece que estos parámetros no definen la afinidad de la interacción de forma directa (Comeau et al., 2004; Kozakov et al., 2017). También este docking nos permite estudiar y acotar los residuos que permiten esta interacción. Se identifico secuencias de residuos del dominio intracelular comunes entre las isoformas de GlyR (Burgos et al., 2016) las cuales eran ³⁵²RFRRK³⁵⁶ y ⁴²⁷KK⁴²⁸ en el caso de α 3L (Moraga Cid, 2009). Además, se establecieron los residuos exclusivos T³⁵⁹; S³⁶⁸; y Y³⁷¹ de GlyR α 3L que intervienen en la interacción. Debido al tamaño de sec8 no existe un consenso en el top 10 de predicciones sobre los residuos específicos de interacción en esta proteína. Por otro lado si bien la experimentación y datos previos solidifican los datos obtenidos por el docking estos aún carecen de confiabilidad debido a en primer lugar que los modelos de las estructuras utilizadas tanto para el ICDRGly α 3 y sec8 son predicciones

que no están confirmadas por experimentación (Du et al., 2015), en segundo lugar la falta de experimentación con la variante K del receptor para definir las posibles diferencias en la interacción con sec8 y en tercer lugar la naturaleza rígida del docking proteína-proteína en el servidor cluspro nos impide notificar parámetros como modificaciones estructurales en el tiempo del acoplamiento de esta interacción (Thompson et al., 2023).



9 CONCLUSIONES

Los ensayos de pull down e inmunocitoquímica han confirmado la interacción entre el dominio intracelular del receptor de glicina y la proteína del complejo de exocitosis sec8. En consonancia con estos resultados, se observa que el complejo de exocitosis sec8 no solo interactúa, sino que también reduce la afinidad aparente del receptor de glicina $\alpha 3$. La presencia de Sec8 tiene un impacto significativo en la amplitud de las corrientes registradas del receptor de glicina $\alpha 3L$, afectando directamente el proceso de desensibilización del receptor y favoreciendo un estado de desensibilización. Esta interacción revela variaciones en los valores energéticos teóricos obtenidos en el docking proteína-proteína, siendo más pronunciadas para $\alpha 3L$.

A través del estudio in silico, se han identificado residuos comunes entre las variantes L y K que participan en la interacción, así como otros exclusivos de la isoforma L del receptor. Se han identificado tres aminoácidos específicos de la isoforma L capaces de formar enlaces de hidrógeno, lo que explica las disparidades en los panoramas energéticos de las isoformas de RGly $\alpha 3$ en su interacción con sec8. Para validar y ampliar estos hallazgos, se replicarán los experimentos y estudios de inmunocitoquímica, pull down y electrofisiología en la isoforma K del receptor. Además, se trabajará en la estandarización y optimización de los distintos protocolos experimentales.

En futuras investigaciones, se buscará ampliar la comprensión de estos mecanismos mediante experimentos en un contexto neuronal, utilizando líneas celulares de neuronas. Se incorporarán estudios de electrofisiología con técnica de canal único y se ajustará el modelamiento de la estructura predicha del dominio intracelular del receptor de glicina $\alpha 3$ para contribuir de manera más concreta a la definición de estos procesos.



10 BIBLIOGRAFIA

1. Aaron, J. S., Taylor, A. B., & Chew, T.-L. (2018). Image co-localization–co- occurrence versus correlation. *Journal of cell science*, 131(3), jcs211847.
2. Adler, J., & Parmryd, I. (2010). Quantifying colocalization by correlation: the Pearson correlation coefficient is superior to the Mander's overlap coefficient. *Cytometry Part A*, 77(8), 733-742.
3. Alexander, S. P. H., Christopoulos, A., Davenport, A. P., Kelly, E., Mathie, A., Peters, J. A., Veale, E. L., Armstrong, J. F., Faccenda, E., Harding, S. D., Pawson, A. J., Southan, C., Davies, J. A., Abbracchio, M. P., Alexander, W., Al-hosaini, K., Bäck, M., Barnes, N. M., Bathgate, R., . . . Ye, R. D. (2021). THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2021/22: G protein-coupled receptors. *British Journal of Pharmacology*, 178(S1), S27-S156. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/bph.15538>
4. Baenziger, J. E., & Corringer, P.-J. (2011). 3D structure and allosteric modulation of the transmembrane domain of pentameric ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology*, 60(1), 116-125.
5. Baer, K., Waldvogel, H. J., Faull, R. L., & Rees, M. I. (2009). Localization of glycine receptors in the human forebrain, brainstem, and cervical spinal cord: an immunohistochemical review. *Front Mol Neurosci*, 2, 25. <https://doi.org/10.3389/neuro.02.025.2009>.
6. Bergstrom, H. C., Lieberman, A. G., Graybeal, C., Lipkin, A. M., & Holmes, A. (2020). Dorsolateral striatum engagement during reversal learning. *Learning & Memory*, 27(10), 418-422.
7. Bregman, H., Simard, J. R., Andrews, K. L., Ayube, S., Chen, H., Gunaydin, H., Guzman-Perez, A., Hu, J., Huang, L., & Huang, X. (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.
8. Burgos, C. F., Yévenes, G. E., & Aguayo, L. G. (2016). Structure and pharmacologic modulation of inhibitory glycine receptors. *Molecular pharmacology*, 90(3), 318-325.
9. Bustos, J. F. (2019). Efectos diferenciales de Sec3 y Sec8 en el establecimiento de la polaridad neuronal y la formación del neocortex.
10. Cascio, M. (2004). Structure and function of the glycine receptor and related nicotinic receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 279(19), 19383- 19386.
11. Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S., & Camacho, C. J. (2004). ClusPro: a fully automated algorithm for protein–protein docking. *Nucleic acids research*, 32(suppl_2), W96-W99.
12. Crowe, J., Dobeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stiiber, D., & Henco, K. (1994). 6xHis-nitro chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Protocols for gene analysis*, 371-387.
13. Dalley, J. W., Cardinal, R. N., & Robbins, T. W. (2004). Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 28(7), 771-784.
14. Du, J., Lü, W., Wu, S., Cheng, Y., & Gouaux, E. (2015). Glycine receptor mechanism elucidated by electron cryo-microscopy. *Nature*, 526(7572), 224- 229.
15. Dumoulin, A., Triller, A., & Kneussel, M. (2010). Cellular transport and membrane dynamics of the glycine receptor. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2, 910.
16. Dutertre, S., Becker, C.-M., & Betz, H. (2012). Inhibitory glycine receptors: an update. *Journal of Biological Chemistry*, 287(48), 40216-40223.

17. Eichler, S. A., Förster, B., Smolinsky, B., Jüttner, R., Lehmann, T. N., Föhling, M., Schwarz, G., Legendre, P., & Meier, J. C. (2009). Splice-specific roles of glycine receptor $\alpha 3$ in the hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 30(6), 1077-1091.
18. Eichler, S. A., Kirischuk, S., Jüttner, R., Schaefermeier, P. K., Legendre, P., Lehmann, T. N., Gloveli, T., Grantyn, R., & Meier, J. C. (2008). Glycinergic tonic inhibition of hippocampal neurons with depolarizing GABAergic transmission elicits histopathological signs of temporal lobe epilepsy. *J Cell Mol Med*, 12(6b), 2848-2866. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00357.x>
19. Einarson, M. B., Pugacheva, E. N., & Orlinick, J. R. (2007). GST Pull-down. *CSH protocols*, 2007, pdb. prot4757-pdb. prot4757.
20. Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (2005). Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nature neuroscience*, 8(11), 1481-1489.
21. Fais, M., Sanna, G., Galio, M., Nguyen, T. T. D., Trần, M. U. T., Sini, P., Carta, F., Turrini, F., Xiong, Y., & Dawson, T. M. (2021). LRRK2 modulates the exocyst complex assembly by interacting with sec8. *Cells*, 10(2), 203.
22. Gerges, N. Z., Backos, D. S., Rupasinghe, C. N., Spaller, M. R., & Esteban, J. A. (2006). Dual role of the exocyst in AMPA receptor targeting and insertion into the postsynaptic membrane. *The EMBO journal*, 25(8), 1623-1634.
23. Gielen, M., & Corringer, P. J. (2018). The dual-gate model for pentameric ligand-gated ion channels activation and desensitization. *J Physiol*, 596(10), 1873-1902. <https://doi.org/10.1113/jp275100>
24. Guzman, L., Moraga-Cid, G., Avila, A., Figueroa, M., Yevenes, G. E., Fuentealba, J., & Aguayo, L. G. (2009). Blockade of ethanol-induced potentiation of glycine receptors by a peptide that interferes with G $\beta\gamma$ binding. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 331(3), 933-939.
25. Harvey, R. J., Depner, U. B., Wässle, H., Ahmadi, S., Heindl, C., Reinold, H., Smart, T. G., Harvey, K., Schütz, B., Abo-Salem, O. M., Zimmer, A., Poisbeau, P., Welzl, H., Wolfer, D. P., Betz, H., Zeilhofer, H. U., & Müller, U. (2004). GlyR $\alpha 3$: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science*, 304(5672), 884-887. <https://doi.org/10.1126/science.1094925>
26. Hawes, S. L., Evans, R. C., Unruh, B. A., Benkert, E. E., Gillani, F., Dumas, T. C., & Blackwell, K. T. (2015). Multimodal plasticity in dorsal striatum while learning a lateralized navigation task. *Journal of Neuroscience*, 35(29), 10535-10549.
27. He, B., & Guo, W. (2009). The exocyst complex in polarized exocytosis. *Current opinion in cell biology*, 21(4), 537-542.
28. Hsu, S.-C., TerBush, D., Abraham, M., & Guo, W. (2004). The exocyst complex in polarized exocytosis. *International review of cytology*, 233, 243- 266.
29. Huang, R., He, S., Chen, Z., Dillon, G. H., & Leidenheimer, N. J. (2007). Mechanisms of homomeric $\alpha 1$ glycine receptor endocytosis. *Biochemistry*, 46(41), 11484-11493.
30. Huang, X., Chen, H., Michelsen, K., Schneider, S., & Shaffer, P. L. (2015). Crystal structure of human glycine receptor- $\alpha 3$ bound to antagonist strychnine. *Nature*, 526(7572), 277-280.
31. Hussein, R. A., Ahmed, M., Breiting, H.-G., & Breiting, U. (2019). Modulation of Glycine Receptor-Mediated Pain Signaling in vitro and in vivo by Glucose [Brief Research Report]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00280>
32. Imlach, W. L., Bhola, R. F., Mohammadi, S. A., & Christie, M. J. (2016). Glycinergic dysfunction in a subpopulation of dorsal horn interneurons in a rat model of

- neuropathic pain. *Sci Rep*, 6, 37104. <https://doi.org/10.1038/srep37104>
33. Jeffrey, G. A., & Saenger, W. (2012). *Hydrogen bonding in biological structures*. Springer Science & Business Media. Johnsen, E., Brandtzaeg, O. K., Vehus, T., Roberg-Larsen, H., Bogoeva, V., Ademi, O., Hildahl, J., Lundanes, E., & Wilson, S. R. (2016). A critical evaluation of Amicon Ultra centrifugal filters for separating proteins, drugs and nanoparticles in biosamples. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 120, 106-111.
 34. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., & Potapenko, A. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583- 589.
 35. Kim, S.-Y., & Hakoshima, T. (2019). GST pull-down assay to measure complex formations. *The Hippo Pathway: Methods and Protocols*, 273-280.
 36. Kozakov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padhorny, D., Yueh, C., Beglov, D., & Vajda, S. (2017). The ClusPro web server for protein–protein docking. *Nature protocols*, 12(2), 255-278.
 37. Kung, A. Y., Rick, C., O'Shea, S., Harrison, N. L., & McGehee, D. S. (2001). Expression of glycine receptors in rat sensory neurons vs. HEK293 cells yields different functional properties. *Neuroscience Letters*, 309(3), 202-206.
 38. Langlhofer, G., Janzen, D., Meiselbach, H., & Villmann, C. (2015). Length of the TM3-4 loop of the glycine receptor modulates receptor desensitization. *Neuroscience Letters*, 600, 176-181.
 39. Langlhofer, G., & Villmann, C. (2016). The intracellular loop of the glycine receptor: it's not all about the size. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9, 41.
 40. Lara, C. O., Burgos, C. F., Silva-Grecchi, T., Muñoz-Montesino, C., Aguayo, L. G., Fuentealba, J., Castro, P. A., Guzmán, J. L., Corringier, P.-J., & Yévenes, G. E. (2019). Large intracellular domain-dependent effects of positive allosteric modulators on glycine receptors. *ACS chemical neuroscience*, 10(5), 2551-2559.
 41. Legendre, P. (2001). The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci*, 58(5-6), 760-793. <https://doi.org/10.1007/pl00000899>
 42. Lemmens, V., Thevelein, B., Vella, Y., Kankowski, S., Leonhard, J., Mizuno, H., Rocha, S., Brône, B., Meier, J. C., & Hendrix, J. (2022). Hetero- pentamerization determines mobility and conductance of Glycine receptor $\alpha 3$ splice variants. *Cell Mol Life Sci*, 79(11), 540. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04506-9>
 43. Luís, C. P. G. (2012). Characterization of glycinergic transmission in an in vitro model of epilepsy
 44. Lynch, J. W. (2004). Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiological reviews*, 84(4), 1051-1095.
 45. Lynch, J. W. (2009). Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology*, 56(1), 303-309.
 46. Lynch, J. W., Zhang, Y., Talwar, S., & Estrada-Mondragon, A. (2017). Glycine receptor drug discovery. *Advances in Pharmacology*, 79, 225-253.
 47. Manzke, T., Niebert, M., Koch, U. R., Caley, A., Vogelgesang, S., Hülsmann, S., Ponimaskin, E., Müller, U., Smart, T. G., Harvey, R. J., & Richter, D. W. (2010). Serotonin receptor 1A-modulated phosphorylation of glycine receptor $\alpha 3$ controls breathing in mice. *J Clin Invest*, 120(11), 4118-4128. <https://doi.org/10.1172/jci43029>
 48. Meier, J. C., Semtner, M., Winkelmann, A., & Wolfart, J. (2014). Presynaptic mechanisms of neuronal plasticity and their role in epilepsy. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 164.
 49. Moraga Cid, G. A. (2009). Identificación de residuos localizados en el dominio citoplasmático entre las regiones TM3 y TM4 críticos para la modulación alostérica de

- receptores de glicina y GABA_A por propofol y etanol.
50. Moretto Zita, M., Marchionni, I., Bottos, E., Righi, M., Del Sal, G., Cherubini, E., & Zacchi, P. (2007). Post-phosphorylation prolyl isomerisation of gephyrin represents a mechanism to modulate glycine receptors function. *The EMBO journal*, 26(7), 1761-1771.
 51. 53. Nemecz, Á., Prevost, M. S., Menny, A., & Corringer, P.-J. (2016). Emerging molecular mechanisms of signal transduction in pentameric ligand-gated ion channels. *Neuron*, 90(3), 452-470.
 52. Nishtala, S. N., Mnatsakanyan, N., Pandhare, A., Leung, C., & Jansen, M. (2016). Direct interaction of the resistance to inhibitors of cholinesterase type 3 protein with the serotonin receptor type 3A intracellular domain. *Journal of neurochemistry*, 137(4), 528-538.
 53. Ooi, A., Wong, A., Esau, L., Lemtiri-Chlieh, F., & Gehring, C. (2016). A guide to transient expression of membrane proteins in HEK-293 cells for functional characterization. *Frontiers in physiology*, 7, 300.
 54. Packard, M. G., & Knowlton, B. J. (2002). Learning and memory functions of the basal ganglia. *Annual review of neuroscience*, 25(1), 563-593.
 55. Patrizio, A., Renner, M., Pizzarelli, R., Triller, A., & Specht, C. (2017). Alpha subunit-dependent glycine receptor clustering and regulation of synaptic receptor numbers. *Scientific reports*, 7(1), 10899.
 56. Peeters, J. (2023). Elucidating the Subcellular Localization of Glycine Receptor Alpha 2 in Animal Models of Schizophrenia: Insights from Striatal Immunohistochemistry.
 57. Perrin, C. L., & Nielson, J. B. (1997). "Strong" hydrogen bonds in chemistry and biology. *Annual review of physical chemistry*, 48(1), 511-544.
 58. Ruiz, A., Campanac, E., Scott, R. S., Rusakov, D. A., & Kullmann, D. M. (2010). Presynaptic GABA_A receptors enhance transmission and LTP induction at hippocampal mossy fiber synapses. *Nature neuroscience*, 13(4), 431-438.
 59. San Martín, V. P., Sazo, A., Utreras, E., Moraga-Cid, G., & Yévenes, G. E. (2022). Glycine Receptor Subtypes and Their Roles in Nociception and Chronic Pain. *Front Mol Neurosci*, 15, 848642. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.848642>
 60. San Martín, V. P., Sazo, A., Utreras, E., Moraga-Cid, G., & Yévenes, G. E. (2022). Glycine Receptor Subtypes and Their Roles in Nociception and
 61. Chronic Pain [Mini Review]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.848642>
 62. Sans, N., Prybylowski, K., Petralia, R. S., Chang, K., Wang, Y.-X., Racca, C., Vicini, S., & Wenthold, R. J. (2003). NMDA receptor trafficking through an interaction between PDZ proteins and the exocyst complex. *Nature cell biology*, 5(6), 520-530.
 63. Schaefer, N., Langlhofer, G., Kluck, C. J., & Villmann, C. (2013). Glycine receptor mouse mutants: model systems for human hyperekplexia. *Br J Pharmacol*, 170(5), 933-952. <https://doi.org/10.1111/bph.12335>
 64. Takazawa, T., Choudhury, P., Tong, C. K., Conway, C. M., Scherrer, G., Flood, P. D., Mukai, J., & MacDermott, A. B. (2017). Inhibition Mediated by Glycinergic and GABAergic Receptors on Excitatory Neurons in Mouse Superficial Dorsal Horn Is Location-Specific but Modified by Inflammation. *J Neurosci*, 37(9), 2336-2348. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2354-16.2017>
 65. TerBush, D. R., Maurice, T., Roth, D., & Novick, P. (1996). The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo j*, 15(23), 6483-6494.
 66. Thomas, P., & Smart, T. G. (2005). HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 51(3),

- 187-200.
67. Thompson, J. R., Beaudoin, C. A., & Lummis, S. C. (2023). Modelling and Molecular Dynamics Predict the Structure and Interactions of the Glycine Receptor Intracellular Domain. *Biomolecules*, 13(12), 1757.
 68. Vayanaperumal, K. (2023). Western Blotting a review: Principle, protocol and problem solving. *GSC Advanced Research and Reviews*, 16(3), 178-187.
 69. Waseem, T. V., & Fedorovich, S. V. (2010). Presynaptic glycine receptors influence plasma membrane potential and glutamate release. *Neurochemical research*, 35, 1188-1195.
 70. Winkelmann, A., Maggio, N., Eller, J., Caliskan, G., Semtner, M., Häussler, U., Jüttner, R., Dugladze, T., Smolinsky, B., & Kowalczyk, S. (2014). Changes in neural network homeostasis trigger neuropsychiatric symptoms. *The Journal of clinical investigation*, 124(2), 696-711.
 71. Wissmueller, S., Font, J., Liew, C. W., Cram, E., Schroeder, T., Turner, J., Crossley, M., Mackay, J. P., & Matthews, J. M. (2011). Protein–protein interactions: analysis of a false positive GST pulldown result. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 79(8), 2365-2371.
 72. Yevenes, G. E., Moraga-Cid, G., Guzman, L., Haeger, S., Oliveira, L., Olate, J., Schmalzing, G., & Aguayo, L. G. (2006). Molecular determinants for G protein $\beta\gamma$ modulation of ionotropic glycine receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 281(51), 39300-39307.
 73. Yevenes, G. E., & Zeilhofer, H. U. (2011). Allosteric modulation of glycine receptors. *British Journal of Pharmacology*, 164(2), 224-236.
 74. Yu, J., Zhu, H., Lape, R., Greiner, T., Du, J., Lü, W., Sivilotti, L., & Gouaux, E. (2021). Mechanism of gating and partial agonist action in the glycine receptor. *Cell*, 184(4), 957-968. e921.
 75. Zeilhofer, H. U., Acuña, M. A., Gingras, J., & Yévenes, G. E. (2018). Glycine receptors and glycine transporters: targets for novel analgesics? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75, 447-465.
 76. Zeilhofer, H. U., Werynska, K., Gingras, J., & Yévenes, G. E. (2021). Glycine Receptors in Spinal Nociceptive Control-An Update. *Biomolecules*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/biom11060846>
 77. Zeilhofer, H. U., Wildner, H., & Yévenes, G. E. (2012). Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiological reviews*.
 78. Zhang, L.-H., Gong, N., Fei, D., Xu, L., & Xu, T.-L. (2008). Glycine uptake regulates hippocampal network activity via glycine receptor-mediated tonic inhibition. *Neuropsychopharmacology*, 33(3), 701-711.
 79. Zhang, Z. Y., Guo, Z., Li, H. L., He, Y. T., Duan, X. L., Suo, Z. W., Yang, X., & Hu, X. D. (2019). Ubiquitination and inhibition of glycine receptor by HUWE1 in spinal cord dorsal horn. *Neuropharmacology*, 148, 358-365. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.02.002>