

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



Modulación de la conductancia unitaria del receptor de glicina variante α_3K por fosforilación mediada por PKA.

Tesis presentada a la escuela de graduados de la Universidad de
Concepción para optar al grado de Magister en Neurobiología

KATHERINE NICOLE FARIÑA OLIVA

Tutor: Dr. Gustavo Moraga-Cid

Co-Tutor: Dr. Gonzalo Yévenes Crisóstomo

**Laboratorio de Neurofarmacología
Departamento de Fisiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción**

Comisión evaluadora: Dr. Luis Aguayo Hernández
Dra. Viviana Torres Águila
Dr. Ariel Ávila Macaya

Concepción, Chile
-2024-

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

Profesores integrantes del comité evaluador:

Profesor Guía

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

Profesor Co-Guía

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

Comisión Evaluadora:

Dr. Luis Aguayo Hernández
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

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

Dr. Ariel Ávila Macaya
Facultad de Medicina

Universidad Católica de la Santísima Concepción

Agradecimientos

En primera instancia quisiera agradecer al proyecto de FONDECYT, que me brindo la posibilidad de desarrollar mi trabajo de investigación para el proyecto de tesis del Magister. De igual manera, agradezco a mi tutor, el Dr. Gustavo Moraga Cid por haberme brindado el apoyo técnico y académico para cumplir mis objetivos y darme la posibilidad de crecer y aprender en su laboratorio. Agradezco también a mi co-tutor el Dr. Gonzalo Yevenes Crisóstomo por su presencia y apoyo constante en mi trabajo. Gracias por permitirme trabajar en sus laboratorios.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio; David Flaig, César Lara, Ana Marileo, Oscar Ramírez, Omayra Contreras, Juliana González, Victoria San Martín, Jessica Panes, Scarlet Gallegos, Sofía Recabarren, quienes no solo aportaron de alguna forma a mi crecimiento científico si no también hicieron que todo el proceso fuera mas ameno y agradable.

Importante destacar a mi amiga, hermana y compañera que me dio la vida universitaria desde sus inicios; Nicole Espinoza, quien afortunadamente realizó este recorrido y aprendizaje conmigo, lo que lo hizo mucho más llevadero y divertido. Siempre escuchando música, cantando y riendo haciendo que el trabajo no se sintiera como tal. Del mismo modo, agradezco a Gabriel González, quien también hizo que este proceso fuera mucho mas liviano y lleno de risas e historias divertidas que contar.

Agradezco a mis amigas Romina, Belén, Leandra, Camila y a mi amigo Diego quienes siempre creyeron en mi.

Finalmente, agradezco también a mi Familia por siempre apoyarme, principalmente a mi hermano Ivar.

Índice de contenidos

Agradecimientos.....	iii
Índice de Figuras y Tablas.....	vi
Abreviaturas.....	vii
Resumen	ix
Abstract	x
i	
Introducción	12
1. Generalidades del Receptor de Glicina (RGli).....	12
2. Las subunidades del RGli	16
3. La subunidad α_3 y sus variantes	20
4. Modulación de la función del RGli α_3	22
MODULADORES DE LA FUNCION DEL RECEPTOR DE GLICINA	24
5. Fosforilación del α_3 RGli por la Proteína Quinasa A (PKA):Mecanismos moleculares y relevancia fisiopatológica	25
5.1 Mutaciones Fosfomimeticas	27
5.2 Adenil Ciclasa Fotoactivable (bPAC)	29
Hipótesis y Objetivos	31
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:	31
1. HIPOTESIS:	31
2. OBJETIVO GENERAL:	32
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	32
Metodología.....	33
Cultivos celulares y transfección:.....	33
1. Plásmidos:.....	33
2. Registros electrofisiológicos en modalidad célula completa.....	35
3. Registros electrofisiológicos de canal único.....	37

4. Inmunocitoquímica:	38
5. Análisis estadísticos:.....	39
Resultados.....	41
1. Efectos de la activación de PKA mediante la incubación con 8-br- cAMP en los patrones de expresión en la superficie de la membrana del RGl α 3K WT mediante inmunocitoquímica en células HEK293.....	41
2. Estudio de los parámetros macroscópicos (EC_{50} , $Imáx$) de RGl α 3K WT y RGl α 3K S346E en células HEK293	43
3. Estudio de los parámetros cinéticos microscópicos de RGl α 3K WT y RGl α 3K S346E en células HEK293 mediante técnicas electrofisiológicas...	46
3.1 Efectos de la activación de bPAC en la variante α 3K WT mediante electrofisiología en Cell-Attached.....	49
3.2 Efectos de un 2,6-DTBP en la mutación fosfomimética de α 3K mediante electrofisiología en Cell-Attached.	50
Discusión	53
Conclusiones.....	56
Bibliografía	57

Índice de Figuras y Tablas

Figura 1: Modulación de la conductancia unitaria del RGLi α 3K.....	x
Figura 2: Esquema de la arquitectura y topología de membrana del receptor de glicina.	13
Figura 3: Esquema de los diferentes estados del receptor de glicina.	16
Figura 4: Esquema de las conformaciones del receptor de glicina.....	17
Figura 5: Esquema de las subunidades del receptor de glicina y su ubicación.....	20
Figura 6: Esquema de las variantes de la subunidad α 3 del receptor de glicina y sus diferencias aminoacídicas en el ICD.	21
Tabla 1: Moduladores de la función del RGLi. (Breitinger, U., & Breitinger, H. 2020)....	24
Figura 7: Esquema del receptor de glicina α 3 relacionado con procesos de sensibilización al dolor crónico.....	27
Figura 8: Esquema comparativo entre una mutación fosfomimética y una fosforilación en el sitio de consenso de fosforilación serina 346.....	28
Figura 9: Esquema de Beggiatoa PAC (bPAC)..	30
Figura 10: Mapa de restricción de vector pcDNA3.1(+).	34
Figura 11: Mapa de restricción de vector pIRES2-EGFP..	35
Figura 12: Imágenes de inmunocitoquímica adquiridas con microscopía confocal de la α 3K WT, α 3K S346E y α 3K S346A.....	42
Figura 13: Registros electrofisiológicos a través de la técnica de Whole Cell en células HEK293 transfectadas con la variante α 3K WT y α 3K S346E.....	45
Figura 14: Registros electrofisiológicos a través de la técnica de Cell-Attached en células HEK293 transfectadas con la variante α 3L WT y α 3L S346E.....	47
Figura 15: Registros electrofisiológicos a través de la técnica de Cell attached en células HEK293 transfectadas con la variante α 3K WT y α 3K S346E.....	49
Figura 16: Registros electrofisiológicos a través de la técnica de Cell Attached en células HEK293 transfectadas con la variante α 3K WT + bPAC.....	50
Figura 17: Registros electrofisiológicos a través de la técnica de Cell-attached en células HEK293 transfectadas con la variante α 3K WT.....	51

Abreviaturas

2,6- DTBP: 2,6-dietilbutilfenol

5-HT₃: Receptor de serotonina tipo 3.

8-br-cAMP: Adenosín monofosfato cíclico no hidrolizable

AC: Adenil ciclasa

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

BLUF: Receptor de luz azul que usa FAD

bPAC: Beggiaoa adenil ciclasa fotoactivable

DEC: Dominio extracelular

DIC: Domino intracelular

DTM: Dominio transmembrana

EP₂R: Receptor de

prostaglandinas de tipo 2

GABA: ácido γ -aminobutírico

GFP: Proteína fluorescente verde

HEK293: Célula embrionaria humana de riñón 293

mCherry: Proteína fluorescente roja

nAChR: Receptor nicotínico de acetilcolina.

PAM: Modulador alostérico positivo

PBS: Buffer de fosfato salino

PGE₂: Prostaglandina E₂

pLGICs: Canales iónicos activados por ligando pentaméricos.

PKA: Proteína quinasa A

PKC: Proteína quinasa C

RGI: Receptor de Glicina.

ROI: Región de interés

SNC: Sistema nervioso central

Resumen

El RGli pertenece a la superfamilia de canales iónicos activados por ligando pentaméricos (pLGICs) y se ha demostrado que subunidades específicas del RGli pueden desempeñar un papel clave en varias enfermedades. En el caso de la subunidad α_3 ; se ha visto relacionada con la nocicepción y mecanismos de sensibilización al dolor crónico. Esta subunidad del receptor de glicina presenta dos variantes; α_{3L} y α_{3K} , que difieren en 15 aminoácidos ubicados en el ICD de la variante α_{3L} y que no presenta la variante α_{3K} . Esto debido al splicing alternativo que elimina el exón 8 del gen GNRL3.

Se ha estudiado un mecanismo de sensibilización al dolor inflamatorio crónico, dependiente de la pérdida de inhibición glicinérgica del RGli α_{3L} , tras la activación de los receptores neuronales EP2 y consecuente activación de PKA.

De modo que, a través de estudios de inmunocitoquímica y registros electrofisiológicos pudimos observar que la mutación fosfomimética o la activación de PKA a través de bPAC, disminuye las corrientes glicinérgica de la variante α_{3K} del RGli. Esta disminución es producto de una disminución en la conductancia unitaria del canal. Por lo tanto, nuestros hallazgos muestran que la variante α_{3K} actúa de una forma similar a la variante α_{3L} del RGli, frente a la activación de PKA mediante bPAC o en el modelo fosfomimético de α_{3K} .

De igual manera, pudimos observar que el PAM del RGli; 2,6-DTBP, restauró la conductancia unitaria del RGli α_{3K} S346E, siendo esta similar a la conductancia de la variante α_{3K} WT del RGli.

Finalmente, el desarrollo de herramientas farmacológicas para la restauración de la actividad glicinérgica podría ejercer efectos anti-nociceptivos, recuperando el equilibrio excitatorio – inhibitorio fundamental en el funcionamiento del SNC.

Graphical Abstract

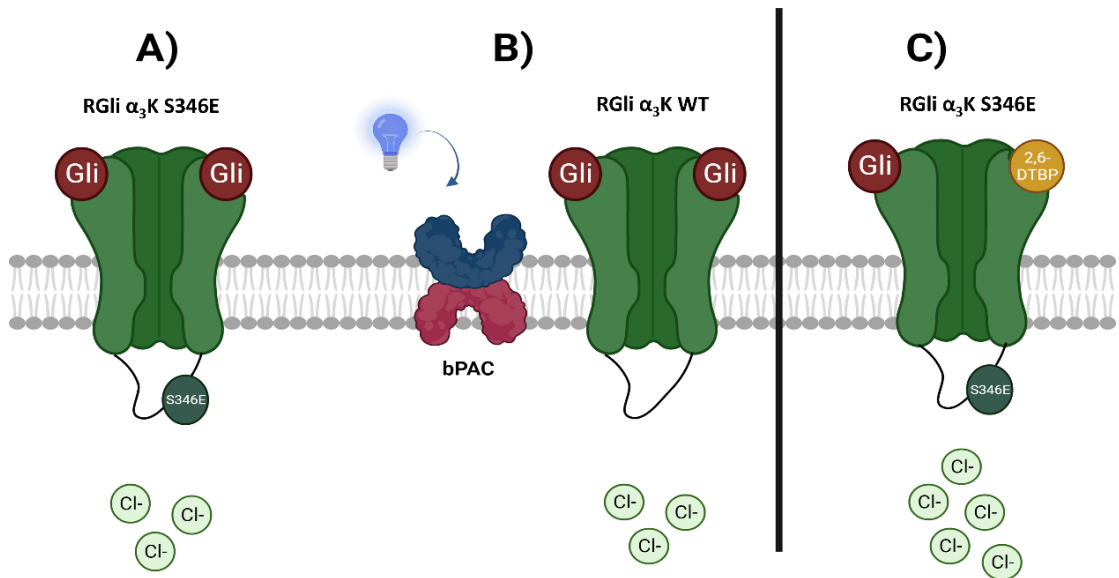


Figura 1: Modulación de la conductancia unitaria del RGLI α_3K . **A)** RGLI α_3K con una mutación fosfomimética en el ICD (S346E), presenta conductancia unitaria reducida. **B)** RGLI α_3K y bPAC activada con luz azul, provoca una reducción de la conductancia unitaria del canal. **C)** RGLI α_3K activado con Gli y un PAM como el 2,6-DTBP provoca una restauración de la conductancia unitaria del canal.

Abstract

RGli belongs to the superfamily of pentameric ligand-gated ion channels (pLGICs) and it has been shown that specific subunits of RGli may play a key role in several diseases. In the case of the α_3 subunit; It has been seen to be related to nociception and mechanisms of sensitization to chronic pain. This subunit of the glycine receptor has two variants; α_3L and α_3K , which differ in 15 amino acids located in the ICD of the α_3L variant and which does not present the α_3K variant. This is due to alternative splicing that eliminates exon 8A of the GNRL3 gene.

A mechanism of sensitization to chronic inflammatory pain has been studied, dependent on the loss of glycinergic inhibition of RGli α_3L , after the activation of EP2 neuronal receptors and consequent activation of PKA.

Thus, through immunocytochemistry studies and electrophysiological recordings we were able to observe that the phosphomimetic mutation or the activation of PKA through bPAC decreases the glycinergic currents of the α_3K variant of RGli. This decrease is the product of a decrease in the unitary conductance of the channel. Therefore, our findings show that the α_3K variant acts in a similar way to the α_3L variant of RGli, against PKA activation by bPAC or in the α_3K phosphomimetic model.

Similarly, we could observe that the PAM of the RGli; 2,6-DTBP restored the unitary conductance of RGli α_3K S346E, this being similar to the conductance of the α_3K WT variant of RGli.

Finally, the development of pharmacological tools for the restoration of glycinergic activity could exert anti-nociceptive effects, recovering the fundamental excitatory-inhibitory balance in the functioning of the CNS.

Introducción

1. Generalidades del Receptor de Glicina (RGli)

El Receptor de glicina (RGli) pertenece a la superfamilia de canales iónicos pentaméricos activados por ligando (pLGICs, por sus siglas en inglés), junto a los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), el receptor de serotonina tipo 3 (5-HT₃) y el receptor de GABA tipo A (GABA_AR) y C (GABA_CR) (Changeux, J. P. & Edelstein, S. J. 1998; Miller, P. & Smart, T. 2010; Lynch, JW. et al., 2017). Cada subunidad, que da origen al complejo pentamérico, corresponde a un polipéptido de aproximadamente 450-500 aminoácidos. Estudios tempranos de topología de membrana mostraron que estas subunidades se ordenan en la membrana formando un dominio extracelular (ECD, por sus siglas en inglés), el cual forma el bolsillo de unión al agonista (glicina), cuatro hélices transmembrana (TM 1-4) donde las cadenas laterales del TM2 forman anillos de constricción en la región del poro, que formarían parte de los filtros de selectividad a aniones, y un largo dominio intracelular (ICD) que conecta los TM3 y TM4 (Lynch, J. 2009; Du et al., 2015; Huang et al., 2017; Yu et al., 2021; Zhu et al., 2021) (**Figura 1**). Recientemente estas predicciones sobre la topología general del RGli han sido corroboradas por estudios estructurales por difracción de rayos X y por criomicroscopía electrónica (Du, J. et al, 2015). Estas estructuras, resueltas a 2.8-3Å, muestran que el ECD además de presentar el sitio ortostérico donde interacciona glicina, presenta sitios alostéricos de modulación para la sulfonamida tricíclica AM-1488 (Bregman, H. et al, 2017) y para su antagonista estriquina, entre otros (Du, J. et al, 2015).

En el caso del ICD, la información estructural no está completa, debido a la alta movilidad intrínseca de esta región dificultando la obtención de datos estructurales de alta resolución (Ivica, J. et al., 2021). Sin embargo, en este último tiempo ha sido altamente estudiado su aspecto funcional en el receptor, incluyendo desensibilización, modulación del canal tanto por sustancias endógenas como exógenas, modificaciones postranscripcionales

y tráfico celular a la membrana y al núcleo (Langlhofer, G. & Villmann, C. 2016; Thompson, J. et al., 2023)

Arquitectura y Topología de membrana

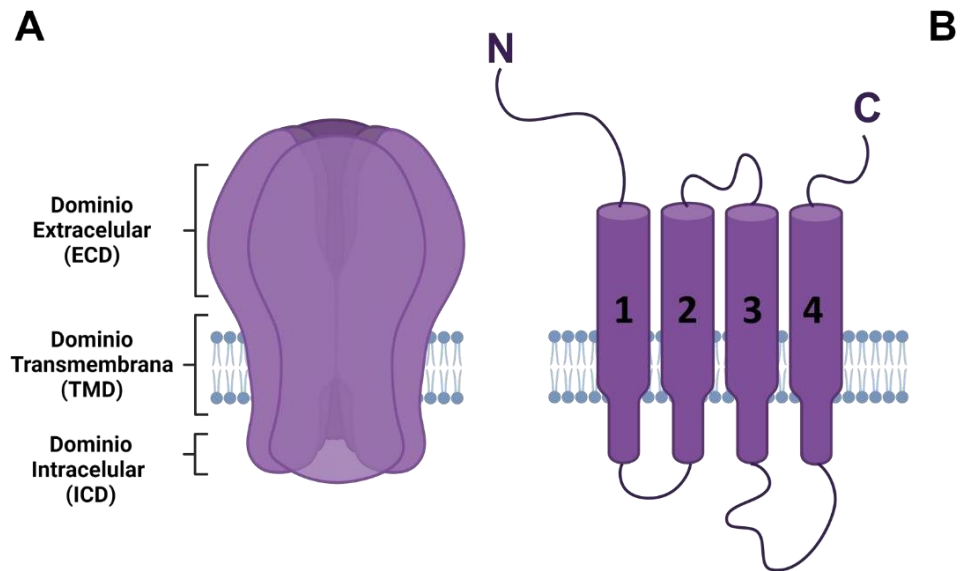


Figura 2: Esquema de la arquitectura y topología de membrana del receptor de glicina. **A)** Receptor de glicina y sus dominios: Dominio Extracelular (ECD), Dominio Transmembrana (TMD) Y Dominio Intracelular (ICD). **B)** Subunidad del receptor de glicina.

El ICD de la subunidad β interactúa con la proteína de andamio Gefirina, que conecta al receptor con elementos del citoesqueleto, regula el tráfico del receptor, por lo que es importante para el anclaje y localización sináptica, además de controlar procesos de traducción de señales (Sola, M. et al., 2004; Lynch, J. 2009). Este bucle puede ser modificado mediante modificaciones postraduccionales y se une a moduladores alostéricos que, a su vez, influyen en las propiedades funcionales del canal iónico. Sin embargo, la evidencia sugiere un papel poco estudiado del bucle presente entre TM3-

TM4 en la interacción con otras proteínas intracelulares (Sadler y col., 2003; Melzer y col., 2010; Langhofer, G. & Villmann, C. 2016).

La secuencia de aminoácidos del bucle TM3-TM4 determina las propiedades del canal de iones. Los conocimientos estructurales del bucle entre TM3- TM4 se limita a pequeños segmentos cercanos a estas regiones, por lo que la información estructural de este bucle no se encuentra completa (Ivica, J. et al., 2021).

La unión del agonista endógeno, glicina, en el sitio ortostérico gatilla un arreglo conformacional a nivel del ECD, el cual es transducido hacia la región del poro del canal (conocido como el proceso de “gating”) lo que expande el poro central, permitiendo el flujo de iones cloruro a favor de su gradiente electroquímico (Lynch, 2009 ; Zeilhofer et al., 2012; Kumar, A. et al, 2020). Una vez activado por glicina, la entrada de iones cloruro causa la hiperpolarización de las neuronas postsinápticas, regulando la excitabilidad de la red neuronal (Lynch, 2009; Dutertre, S, et al. 2012).

De esta forma, el canal transita entre un estado inactivo/cerrado (no unido al agonista) y el estado activo/abierto (unido al agonista) (**Figura 2**). Un tercer estado (no comprendido totalmente) corresponde a un estado unido al ligando, pero inactivo/cerrado, conocido como estado desensibilizado (Nikolic y col., 1998; Breitinger et al.,2009; Langhofer, G. & Villmann, C. 2016; Kumar, A. et al, 2020).

Esta transición entre el estado inactivo/cerrado, el estado activo/abierto y el estado desensibilizado, está determinada por la afinidad del receptor por el agonista, sumado a las propiedades cinéticas intrínsecas del receptor (Kumar, A. et al, 2020). Estas propiedades determinan el tiempo promedio en que el receptor pasa en su estado abierto o cerrado, el tiempo que transcurre desde el estado abierto al estado desensibilizado y la cantidad de iones que pasan por el canal abierto por unidad de tiempo, conocido como conductancia (Moraga Cid et al., 2022) Estas propiedades intrínsecas corresponden a la firma identificatoria para cada tipo de receptor.

El receptor de glicina se encuentra distribuido en el hipocampo, médula

espinal y tronco encefálico, en particular en los núcleos trigémino, el núcleo cuneiforme, el núcleo grácil, el núcleo moto hipogloso, los núcleos reticulares y los núcleos cocleares (Probst. A, et al 1986; Lynch. J, 2004). De igual manera, se ha observado una expresión menor del receptor de glicina en la retina, el oído interno y el hipocampo (Lynch, J. 2004).

Se ha observado que el RGli participa en la coordinación motora, controlando la excitabilidad de las motoneuronas de la médula espinal y el tronco encefálico, control del ritmo respiratorio y mecanismos de control en el procesamiento sensorial. (Lynch, J. 2009)

Alteraciones en la neurotransmisión glicinérgica puede ocurrir por: genes mutados que codifican diversas subunidades del receptor de glicina o proteínas adyacentes del complejo del receptor, edición del receptor o modulación del receptor por mecanismos postraduccionales. Este tipo de alteraciones puede conducir a déficits neuromotores como hiperekplexia (Bakker, van Dijk, van den Maagdenberg, & Tijssen, 2006; Bode, A. & Lynch, J., 2014), epilepsia del lóbulo temporal (Eichler et al., 2009, 2008; Meier et al., 2005), trastornos espectro autista (Lionel et al., 2013; Zhang, Y. et al., 2017) o sensibilización al dolor inflamatorio crónico (Acuña, M. et al., 2016; Lynch, J. 2017)

Estados del Receptor de Glicina

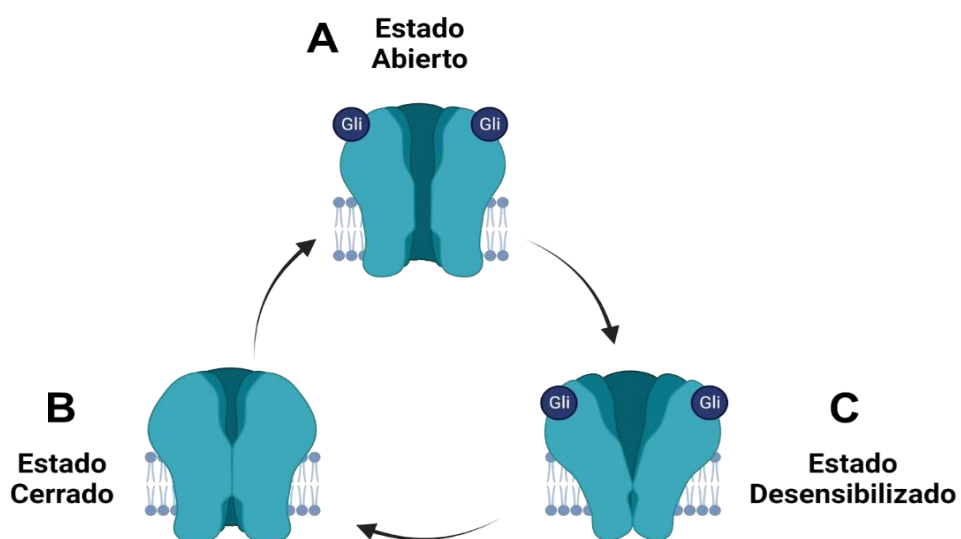


Figura 3: Esquema de los diferentes estados del receptor de glicina. A) Estado Abierto: El receptor unido al agonista y el canal abierto. B) Estado Cerrado: El receptor no está unido al agonista y el canal está cerrado. C) Estado desensibilización: El receptor está unido al agonista y el canal se encuentra cerrado.

2. Las subunidades del RGli

El receptor de glicina puede presentarse en una conformación homopentamérica, conteniendo solo subunidades alfa (α) o heteropentaméricas conteniendo subunidades alfa y beta (α/β) con una estequiometría de $2\alpha:3\beta$ (Durisic et al., 2012; Yang, Taran, Webb y Lynch, 2012), sin embargo, un estudio reciente describió una estequiometría de $4\alpha:1\beta$ (Yu, H. et al., 2021; Zhu et al., 2021) (**Figura 3**). A la fecha, cuatro subunidades α (α_1 - α_4) han sido clonadas, las cuales aun cuando comparten un alto grado de similitud en su secuencia primaria (>90% aproximadamente) (Dutertre et al., 2012; Lynch, J. 2017), presentan diferentes patrones de expresión a lo largo del Sistema Nervioso Central y diferentes propiedades fisicoquímicas y farmacológicas (Lynch, J. W., et 2004; Lynch, 2009; Yevenes et al., 2010; Zeilhofer et al., 2018). Mientras que entre subunidades α y la subunidad β existe una identidad de aminoácidos menor al 50% (Dutertre et al., 2012)

Conformaciones del Receptor de Glicina

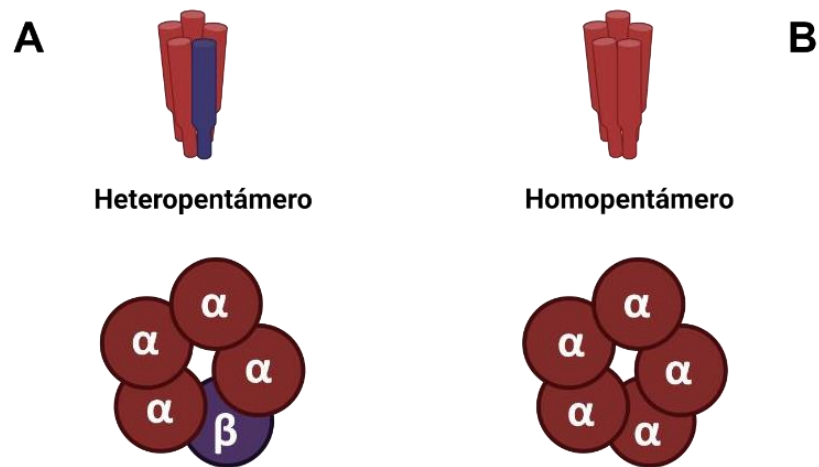


Figura 4: Esquema de las conformaciones del receptor de glicina. A) Conformación heteropentamérica. **B)** Conformación homopentamérica.

La subunidad α_1 del RGLi se expresa ampliamente a lo largo de la médula espinal y tronco encefálico a partir de la tercera semana postnatal (Lynch, J. 2009). Diferentes líneas de investigación sugieren que gran parte de la neurotransmisión glicinérgica en adultos está mediada por el receptor heteromérico $\alpha_1\beta$ (Lewis, TM. et al., 2003; Lynch, J. 2009) y se ha observado que modificaciones en el gen GRLA1 que permite la expresión de esta subunidad del RGLi provoca fenotipos hiperekpléxicos en ratones (Schaefer et al., 2013; Bode and Lynch, 2014).

De igual manera, se ha caracterizado la expresión y función de esta subunidad del receptor en poblaciones neuronales relacionadas a los

circuitos de recompensa del cerebro (Munoz et al., 2018; Gallegos et al., 2019; Munoz et al., 2020).

En cuanto a la subunidad α_2 , en el estado embrionario se encuentra distribuido ampliamente en todas las capas de la corteza cerebral, diencéfalo, núcleo accumbens, el núcleo estriado, hipocampo, tálamo, cerebelo, tronco encefálico y medula espinal (Kuhse et al., 1991; Avila et al., 2013; McCracken et al., 2017). Se ha observado en diversos estudios que está involucrado en la migración cortical, la neurogénesis y la memoria de reconocimiento (Avila et al., 2013; Pilorge et al., 2016; Lin et al., 2017). Esta subunidad, en mamíferos adultos, posee una baja o ausente expresión en la asta dorsal de la medula espinal (Lynch, J. W, 2009; Zeilhofer, H. U., et al. 2012; San Martin, V. P., et al. 2022). Sin embargo, se observa ARNm α_2 en el hipocampo, la corteza cerebral y el tálamo de adultos (Malosio et al., 1991; Sato, Kiyama y Tohyama, 1992; Lynch, J. 2004, Araya et al., 2021).

La subunidad α_3 comienza a expresarse a partir de las dos semanas postnatal en retina, hipocampo, cerebro anterior y laminas superficiales de la medula espinal (Harvey et al., 2004; Lynch, 2009; McCracken et al., 2017), en adultos se encuentra restringida a la red respiratoria del tronco encefálico contribuyendo al control de la respiración, a las láminas superficiales I, II y III del asta dorsal de la medula espinal contribuyendo al procesamiento sensorial (Harvey et al., 2004; Manzke et al., 2010; Długaiczek et al., 2016; Tziridis et al., 2017). Diferentes estudios han evidenciado que $\alpha_3\beta$ RGli es un importante mediador de la neurotransmisión inhibitoria glicinérgica en circuitos neuronales sensoriales nociceptivos en láminas del asta dorsal de la médula espinal (Lynch, J. 2009).

Cabe destacar que existe poca evidencia de la expresión funcional del gen que permite la expresión de la subunidad α_4 en ratas (Lynch, 2009) (**Figura 4**).

Por su parte, la subunidad β del receptor de glicina, se encuentra expresada tanto en periodos pre y postnatales en todo el sistema nervioso central (Malosio et al., 1991; Aguayo et al., 2004; Lynch, 2009). Esta subunidad no forma canales homoméricos funcionales, pero es clave para la formación de “clusters” o agrupaciones de receptores (Lynch, J. 2009). De igual manera, otorga mayor estabilización de los receptores de glicina en la sinapsis, ya que permite la interacción del ICD de la subunidad con la proteína de andamiaje; Gefirina. (Sola, M. et al., 2004; Lynch, J. 2009; Tyagarajan and Fritschy, 2014; Groeneweg et al., 2018) Gefirina es una proteína citoplasmática de 98kDa que es esencial en el anclaje del receptor al citoesqueleto, así como en la agrupación de receptores en densidades postsinápticas mediante la subunidad β y los microtúbulos intracelulares (Fritschy et al., 2008).

Finalmente, se tiene conocimiento actualmente que los receptores de glicina sinápticos comprenden mayoritariamente complejos heteroméricos (Lynch, 2009).

Subunidades del Receptor de Glicina

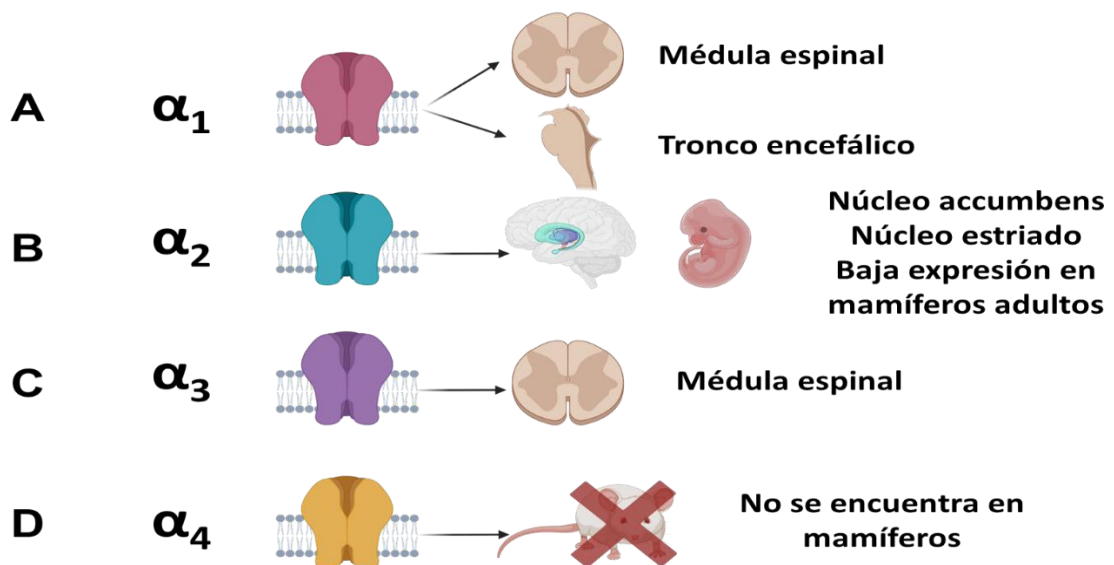


Figura 5: Esquema de las subunidades del receptor de glicina y su ubicación. **A)** Subunidad α_1 presente en medula espinal y tronco encefálico. **B)** Subunidad α_2 presente en el núcleo accumbens y el núcleo estriado y su expresión disminuye o es ausente en la medula espinal de mamíferos adultos, no así en el cerebro. **C)** Subunidad α_3 presente principalmente en el asta dorsal de la médula espinal. **D)** Subunidad α_4 no se expresa en mamíferos.

3. La subunidad α_3 y sus variantes

El RGli α_3 es expresado en la forma de dos variantes posibles: α_3L o α_3K . Estas proteínas son producto del empalme alternativo que elimina el exón 8 del gen GLRA3 (Nikolic, Z. et al., 1998; Lemmens, V. et al., 2021). Esta modificación postraduccional resulta en la eliminación de 15 residuos (TEFALEKFYRFSDT) en el ICD de la variante α_3K , produciendo distintos patrones en la distribución subneuronal, conductancia unitaria, desensibilización, agrupamiento, interacciones con componentes subcelulares y propiedades de difusión en la membrana (Lemmens, V. et al., 2021). Por ejemplo, se ha descrito que el exón 8A confiere propiedades diferentes en el tráfico subcelular y el agrupamiento de RGli α_3 , debido a que el segmento TEFALEKFYRFSDT, facilita la interacción del receptor con la proteína SEC8 (Wilkenman, A. et al., 2014) (**Figura 5**). Además, se ha demostrado que ambas variantes se co-expresan en neuronas; la variante α_3L se localiza principalmente en las pre-sinápsis, mientras que la variante α_3K se localiza en el soma y dendritas (Nikolic, Z. et al., 1998; Wilkenman, A. et al., 2014). Un estudio reciente ha demostrado que ambas variantes difieren en sus corrientes unitarias. Mientras la variante α_3L mostró una conductancia principal de ~ 40 pS (2.3 pA), la conductancia de la variante α_3K fue de ~ 96 pS (6.2 pA). La incorporación de la variante α_3K al pentámero, produjo conductancias unitarias de ~ 96 pS en el receptor α_3L/α_3K (Lemmens, V. et al., 2021).

De manera interesante, diversos estudios han observado que en el hipocampo

de los pacientes con epilepsia se expresa predominantemente la isoforma de empalme largo α_3L (Langlhofer, G. & Villmann, C. 2016). Por otra parte, la evidencia experimental adjudica un papel crítico en el dolor inflamatorio crónico al receptor de glicina α_3 presente en el asta dorsal. (Ahmadi et al., 2002; Harvey et al., 2004; Zelhofer, H. et al., 2021)

Desafortunadamente, estos estudios que comparan ambas variantes no profundizan sobre los determinantes moleculares que determinan estas diferencias.

A raíz de estas observaciones, los datos experimentales mostraron que la conductancia de la variante α_3L es modulada por eventos de fosforilación mediada por PKA mecanismo que se ha visto relacionado con mecanismo de sensibilización al dolor inflamatorio crónico (Moraga Cid, et al., 2020)

Como mencionamos antes, estos eventos de fosforilación han sido implicados en la generación de eventos de dolor crónico (Ahmadi, S. et al., 2002; Harvey et al., 2004; Velazquez Flores, M. A & Salceda, R. 2011; Zeilhofer et al., 2018)

Variantes de la subunidad α_3 del RGLi

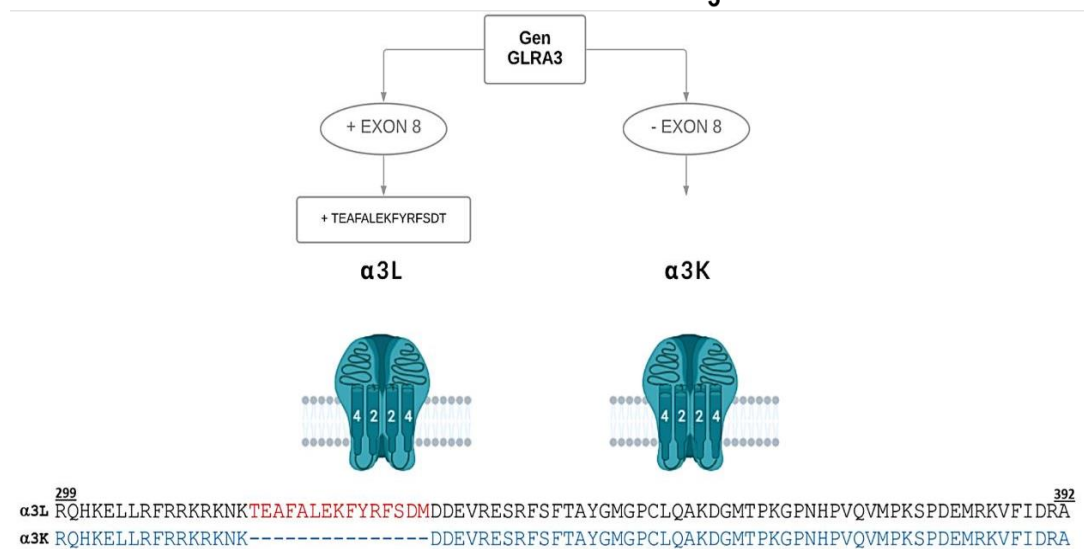


Figura 6: Esquema de las variantes de la subunidad α_3 del receptor de glicina y sus diferencias aminoacídicas en el ICD.

4. Modulación de la función del RGLI α_3

Diferentes estudios se han dedicado a estudiar las sinapsis inhibitorias producidas por los receptores de glicina presentes en el sistema nervioso. Varias moléculas de origen endógeno o exógeno (**Tabla 1**) son capaces de alterar las propiedades funcionales del canal; conocidos como moduladores alostéricos. Estas moléculas poseen una variada naturaleza química entre los cuales se encuentran alcoholes, anestésicos generales, neuroesteroides, Zinc y cannabinoides (Yu, J. et al., 2021).

Actualmente, la estricnina es el antagonista más clásico y potente del receptor de glicina. Es un alcaloide aislado de *Strychnos nux vomica*, altamente tóxico, no tiene color y posee un sabor amargo. Es comúnmente utilizado en pesticidas para vertebrados pequeños, pájaros y roedores (Pribilla, I. et al., 1992; Breitinger, U., & Breitinger, H. 2020).

Se tiene conocimiento de que moduladores alostéricos tales como: el analgésico AM-3607, taurina, cafeína, colchicina, Zinc, tropeinas, etanol y β -alanina se unen en el ECD. Las bajas concentración de estos compuestos inhiben competitivamente respuestas mediadas por glicina, mientras que concentraciones más altas provocan una corriente significativa (Breitinger, U., & Breitinger, H. 2020).

Estudios anteriores han demostrado que moléculas tales como: ivermectina, tetrahidrocannabinidiol (THC) (Yevenes, G. E., & Zeilhofer, H. U, 2011), etanol (Burgos, CF. et al., 2015) , anestésicos generales, anestésicos volátiles, presentan sitio de unión en el TMD (Breitinger, U., & Breitinger, H. 2020).

A pesar de que no se ha resuelto la estructura de alta resolución del ICD, durante la última década, el ICD ha emergido como un componente estructural relevante en términos de la modulación alostérica del receptor (Bregman, H. et al., 2017). Por ejemplo, se han descrito sitios que median los efectos de etanol y propofol localizados en el ICD (Burgos, CF. Et al., 2015; Yevenes, G. E., & Zeilhofer, H. U, 2011)

Además, esta región también cumple un rol fundamental en la modulación del RGli por componentes intracelulares (Bregman, H. et al., 2017; Ivica, J. et al., 2020).

Se han identificado sitios de interacción de endocannabinoides (Yévenes, G. E. et al., 2011), etanol (Mihic, S. J. et al., 1997), ubiquitinación (Villmann, C. et al., 2009) y fosforilaciones producidas por proteínas quinasas A (Breitinger, U. et al., 2018) y C (Vaello, M. L. et al., 1994; Han, L. et al 2013; Langlhofer, G. & Villmann, C. 2016; Breitinger, U., & Breitinger, H. 2020) en el ICD del RGli.

Así, se han descrito residuos localizados en el ICD, que median la interacción del RGli con el heterodímero $G\beta\gamma$, interacción que potencia la función del receptor (Yévenes et al., 2003; Yévenes et al., 2006). De igual forma, se ha descrito que existen sitios de fosforilación mediada por PKA/PKC (Naito, A. et al., 2015).

Uno de los primeros datos que muestran analgesia dependiente del receptor de glicina proviene de estudios realizados con un derivado sintético de los fitocannabinoides de-hidroxicannabidiol (DH-CBD) (Lara, C. O. et al., 2020).

De igual manera, el 2,6-di-tercbutilfenol (2,6-DTBP) un análogo no sedante del Propofol, mejoro la corriente evocada por glicina de α_1 y α_3 . En modelos de dolor inflamatorio, redujo la hiperalgesia inflamatoria en un receptor α_3 dependiente. De igual manera, el derivado del Propofol fue capaz de ampliar la cinética del tiempo de decaimiento de la corriente sináptica glicinérgica en las neuronas del asta dorsal de animales inflamados o después de la activación de EP2 con PGE2 lo que sugiere la recuperación de la inhibición glicinérgica espinal como principal mecanismo de acción (Acuña, M. A. et al., 2016; Lara, C. O. et al., 2020).

Tabla 1: Moduladores de la función del RGLi. (Breitinger, U., & Breitinger, H. 2020).

MODULADORES DE LA FUNCION DEL RECEPTOR DE GLICINA			
Glicina	Agonista	Histamina	Antagonista
b-alanina	Agonista parcial	Picotroxina	Antagonista
Taurina	Agonista parcial	Resveratrol	Antagonista
Ivermectina	Agonista	Estricnina	Antagonista
Bicuculina	Antagonista	Anandamida	Modulador Bifásico
Cafeína	Antagonista	Canabidiol	Modulador Bifásico
Clozapina	Antagonista	Propofol	Modulador alostérico positivo
Colchicina	Antagonista	Etanol	Modulador alostérico positivo
Fluoxetina	Antagonista	Gelsimina	Modulador Bifásico
AM-3607	Modulador alostérico positivo	Pentobarbital	Modulador alostérico positivo
Melatonina	Modulador alostérico positivo	2,6-DTBP	Modulador alostérico positivo
PKA	Por fosforilación	PKC	Por fosforilación

5. Fosforilación del α_3 RGli por la Proteína Quinasa A (PKA): Mecanismos moleculares y relevancia fisiopatológica

La fosforilación es una de las modificaciones postraduccionales que regulan diversas funciones biológicas y que pueden modular receptores de membrana provocando cambios conformacionales, de expresión, de internalización, de movilización incluso puede alterar los parámetros microscópicos propios del receptor. (Breitinger, U., & Breitinger, H. 2020).

Un estudio realizado en neuronas del asta dorsal de ratones demostró que solo las corrientes evocadas por glicina se veían disminuidas cuando el receptor EP2 se activaba con PGE2, a diferencia de lo que ocurría en las corrientes evocadas por los receptores de GABA, AMPA y NMDA, que no se veían afectadas por la aplicación de PGE2. (Ahmadi, S., et al., 2002).

En este contexto, se ha reportado al RGli como un sustrato de diferentes quinasas, viendo su actividad mayormente asociada a los diversos sitios de fosforilación descritos que están presentes en el bucle intracelular, que se encuentra entre TM3 y TM4. (Naito, A. et al., 2015; Lynch. J, et al., 2007).

Entre las proteínas quinasas que desempeñan un papel en la modulación de la función del RGli, se destaca PKA. La evidencia experimental ha demostrado que la disminución de las corrientes glicinérgica espinales provocada por la fosforilación dependiente de PKA en el RGli, está específicamente restringida a los RGli heteroméricos α_1 y α_3 sináptico. (Zeilhofer, H. 2005; San Martin, V. P., et al. 2022)

Estudios realizados con ratones knockout para α_3 permitió identificar que dicha subunidad es esencial para los efectos de activación de PKA por los receptores EP2 por PGE2. Por lo que la disminución de las corrientes glicinérgicas de la subunidad α_3 del RGli se encuentra relacionada con la sensibilización al dolor inflamatorio crónico (Harvey R.J et al 2004; Acuña, M. et al., 2016).

Finalmente, estudios realizados con la variante L de la subunidad α_3 del RGli, demuestran que la fosforilación realizada por PKA en el residuo

Serina 346 presente en el ICD del receptor, provoca una disminución de la amplitud de las corrientes glicinérgica (Harvey R J, et al 2004), y que esta no se produce por una pérdida en la afinidad aparente del receptor por su ligando ni por cambios en la expresión del receptor, sino por una disminución significativa de la conductancia unitaria del receptor. (Moraga Cid et al., 2020) **(Figura 6)**

La evidencia anteriormente mencionada ha llevado al desarrollo de herramientas farmacológicas para la reparación de la actividad glicinérgica. Nuevos estudios han proporcionado evidencia de que los moduladores alostéricos positivos (PAM) del receptor de glicina ejercen efectos anti-nociceptivos en modelos preclínicos de dolor crónico (San Martín, V. P., et al. 2022).

Por lo tanto, restaurar la actividad del RGl α_3 sináptico a través de moduladores alostéricos positivos puede constituir un enfoque terapéutico basado en mecanismos contra el dolor inflamatorio crónico. (Acuña. M , et al., 2016; Zeilhofer et al., 2018, 2021).

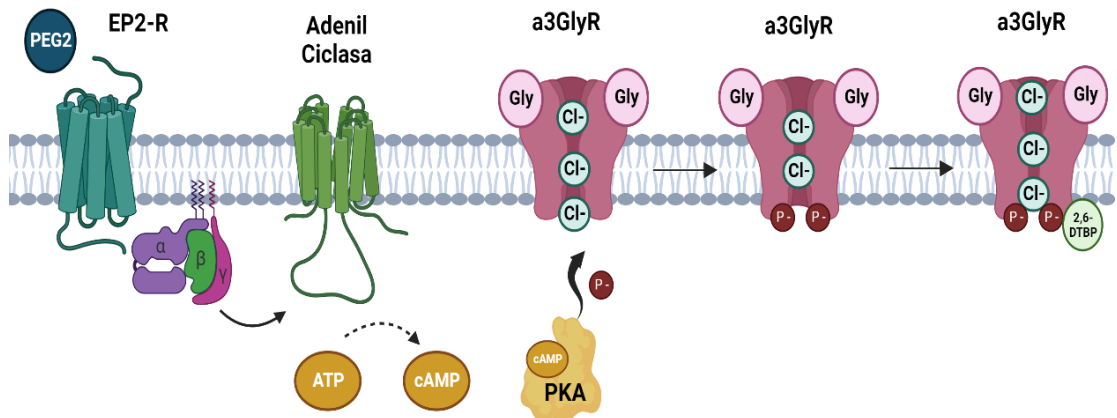


Figura 7: Esquema del receptor de glicina $\alpha 3$ relacionado con procesos de sensibilización al dolor crónico. Activación del receptor EP2 por prostaglandinas de tipo 2 que genera una cascada de señalización que provoca la activación de la PKA y la posterior fosforilación del receptor de glicina

A partir de los antecedentes presentados, diferentes metodologías se han utilizado para realizar estudios de fosforilación a partir de diferentes técnicas, tales como: modificaciones químicas de residuos de aminoácidos (mutación fosfomimética) (**Figura 8**), activación de PKA mediante bPAC (**Figura 9**), incubaciones con 8-Br- cAMP, activación de AC por Forskolina, entre muchas otras técnicas que permiten la simulación o activación directa o indirecta de PKA, facilitando la realización de estudios enfocados en el mecanismo molecular de acción de PKA con un receptor de membrana.

5.1 Mutaciones Fosfomiméticas

Diferentes estudios han utilizado modificaciones químicas para simular efectos de las fosforilaciones producidas por proteínas quinasas intercambiando residuos de Serina o Treonina, como sitios de consenso de fosforilación para proteínas quinasas, por residuos de ácido glutámico o ácido aspártico (Acuña M.A, et al., 2016; Moraga Cid., et al. 2020). Debido a que estos aminoácidos presentan, a pH fisiológico, carga negativa que simula la incorporación de grupos fosfatos a los residuos. (**Figura 8**)

DIFERENCIA ENTRE MUTACIÓN FOSFOMIMÉTICA Y FOSFORILACIÓN

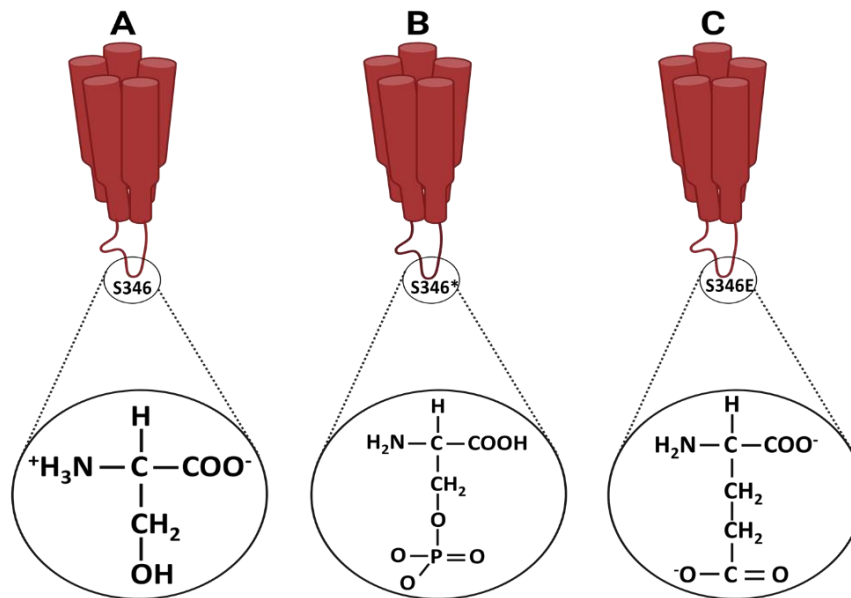


Figura 8: Esquema comparativo entre una mutación fosfomimética y una fosforilación en el sitio de consenso de fosforilación serina 346. **A)** ICD del RGLi y el sitio de consenso de fosforilación; Serina 346. **B)** ICD del RGLi destacando el residuo Serina 346 fosforilado por una quinasa (*). **C)** ICD del RGLi con la mutación fosfomimética S346E.

5.2 Adenil Ciclasa Fotoactivable (bPAC)

La optogénica nos permite manipular de forma no invasiva y precisa en un espacio-temporal las funciones celulares, combinando la ingeniería genética con el control de la función de proteínas mediante la luz. (Jansen V. et al., 2017)

Un estudio identificó en el genoma de la bacteria *Beggiatoa*, una secuencia de ADN que codifica una adenil ciclasa directamente unida a un dominio sensor de luz de tipo BLUF; bPAC (**Figura 9**) (Stierl M. et al., 2010)

bPAC, funciona como un dímero, formado por las interacciones de dos hélices BLUF α_3 , lo que hace que las modificaciones de la cinética de los fotorreceptores sean más sencillas. El peso molecular de bPAC es de 33kDa. La distancia desde el amino terminal al cromóforo es de 2.09 nm (Kinjo T. et al., 2020)

En la oscuridad, bPAC presenta una actividad reducida ya que ocasionalmente asume una conformación catalíticamente competente y genera cAMP. La absorción de luz extiende el ángulo de apertura y reposiciona los residuos catalíticos para interactuar mejor con el sustrato y catalizar la reacción. (Yang S. et al., 2021) De igual manera, puede ser activada con luz LED 455nm (Jansen V. et al., 2017)

Estudios realizados con bPAC demostraron que las elevaciones de AMPc inducidas por la luz en las neuronas, son altamente reproducibles y proporcionales a la dosis de luz, lo que hace posible de forma no invasiva, el control de la luz y en consecuencia la concentración de AMPc en la biología celular y las neurociencias. (Stierl M. et al., 2010) Por lo tanto, bPAC se ha convertido en la herramienta preferida para la realización de estudios que utilizan PAC para aumentar los niveles de AMPc intracelular. (Jansen V. et al., 2017) Esta herramienta nos permite producir AMPc de forma más rápida dentro de las células y se ha aplicado a varios tipos de células y animales. (Kinjo T. et al., 2020).

En comparación con las otras PAC existentes la manipulación farmacológica,

la rápida reversibilidad y el aumento de la resolución temporal y espacial que confiere el uso de bPAC es una ventaja al estudiar la señalización rápida y compartimentada de AMPc (Yang S. et al., 2021)

Representación estructura bPAC

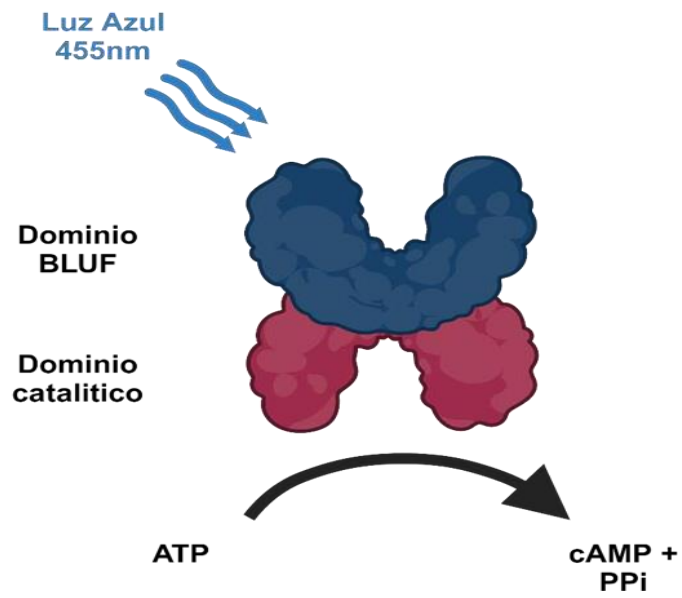


Figura 9: Esquema de *Beggiatoa* PAC (bPAC). Dominio BLUF y dominio catalítico de bPAC.

Hipótesis y Objetivos

El RGLi α_3 juega un rol crítico en la fisiología normal del SNC. Su mal funcionamiento ha estado ligado a la aparición de eventos patológicos como epilepsia del lóbulo temporal (Eichler et al., 2009, 2008; Meier et al., 2005), y dolor crónico (Acuña, M. et al., 2016) (Lynch, J. 2017). El RGLi α_3 presenta dos variantes producto de un proceso de empalme alternativo postraduccional; α_3L y α_3K (Nikolic, Z. et al., 1998; Lemmens, V. et al., 2021). Estas variantes presentan diferencias en sus patrones de expresión, localización subcelular, función y modulación por proteínas intracelulares (Lemmens, V. et al., 2021). La evidencia experimental ha demostrado que el RGLi α_3 juega un rol importante en la generación de procesos de dolor crónico (Ahmadi et al., 2002; Harvey et al., 2004; Zelhofer, H. et al., 2021). Estos eventos son mediados por una reducción de la función del RGLi α_3 por procesos de fosforilación mediada por PKA (Ahmadi, S., et al., 2002). La fosforilación del residuo S346, localizado en el ICD de la variante α_3L , produce una disminución significativa de la conductancia unitaria del canal (Moraga Cid et al., 2020). Sin embargo, aun cuando ambas variantes pueden ser co-expresadas en un mismo pentámero, el impacto de la fosforilación en la variante α_3K aún no ha sido estudiada.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

- 1.- ¿Cómo afecta la utilización de una mutante fosfomimética o la activación de PKA a través de bPAC a la conductancia unitaria de la variante RGLi α_3K ?
- 2.- ¿Puede ser restablecida la conductancia de la variante α_3K S346E del RGLi por un PAM?

1. HIPOTESIS:

- 1.- La modificación química de un residuo en el ICD o la activación de PKA mediante bPAC disminuye la conductancia unitaria de la variante α_3K del RGLi.

2.- La reducción de la conductancia unitaria de la variante α_3K del RGLi puede ser revertida por un PAM como el 2,6-DTBP

2. OBJETIVO GENERAL:

Determinar el efecto de la mutación fosfomimética y la activación de PKA en la función de la variante RGLi α_3K expresada en células HEK293.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar el efecto de una mutación fosfomimética en los patrones de expresión en la superficie de la membrana de la variante RGLi α_3K mediante estudios de inmunocitoquímica y microscopía confocal.
2. Determinar los efectos de una mutación fosfomimética en los parámetros macroscópicos de la variante RGLi α_3K (EC50, Imáx) mediante electrofisiología con la técnica de Whole-Cell.
3. Determinar los efectos de una mutación fosfomimética o la activación de PKA mediante bPAC en los parámetros microscópicos de la variante RGLi α_3K (Conductancia unitaria, probabilidad de apertura) mediante electrofisiología con la técnica de Cell-Attached.
4. Determinar si la conductancia unitaria de la mutación fosfomimética realizada en el ICD de la variante α_3K es afectada por un PAM como el 2,6- DTBP.

Metodología

Cultivos celulares y transfección:

Se utilizaron células HEK 293 (Human Embryonic Kidney), las cuales fueron cultivadas y sembradas en vidrios de 18mm (para los experimentos de patch clamp) y de 12 mm (para los experimentos de inmunocitoquímica) con medio D-MEM (Dubelcco's modified Eagle médium) y FBS (suero fetal de bovino) al 10% en una incubadora termo regulada con 5% de CO₂ a 37°C.

Las células sembradas se transfectaron con los vectores codificantes para las diferentes variantes de la subunidad α_3 y sus mutaciones fosfomiméticas, luego de 48 horas aproximadamente al alcanzar una confluencia de 70%. Se utilizó Lipofectamina 2000 (Invitrogen) para la transfección y se agregó en una proporción de 0,7 μ l por cada 1 μ g de DNA en 50 μ L de Opti-MEM® I (1x) (Invitrogen). Esta mezcla es agregada directamente sobre las células, las cuales serán estudiadas después de 18 a 24 horas post-transfección.

Para obtener los registros realizados con la fibra óptica se co-transfectó en una relación de 2:2:1 los plásmidos de α_3 K, bPAC y mCherry respectivamente.

1. Plásmidos:

Los plásmidos utilizados en este proyecto son los siguiente (gen/vector): GFP/pGreenLatern, RGli- α_3 L/pcDNA3, RGli- α_3 L^{S346E}/pcDNA3 (Moraga Cid et al., 2020), RGli- α_3 K/pcDNA3, RGli- α_3 K^{S346E}/pcDNA3, RGli- α_3 K^{S346A}/pcDNA3, pcDNA3.1/hChR2(H134R)-mCherry, b-PAC pCl, todos disponibles en nuestro laboratorio

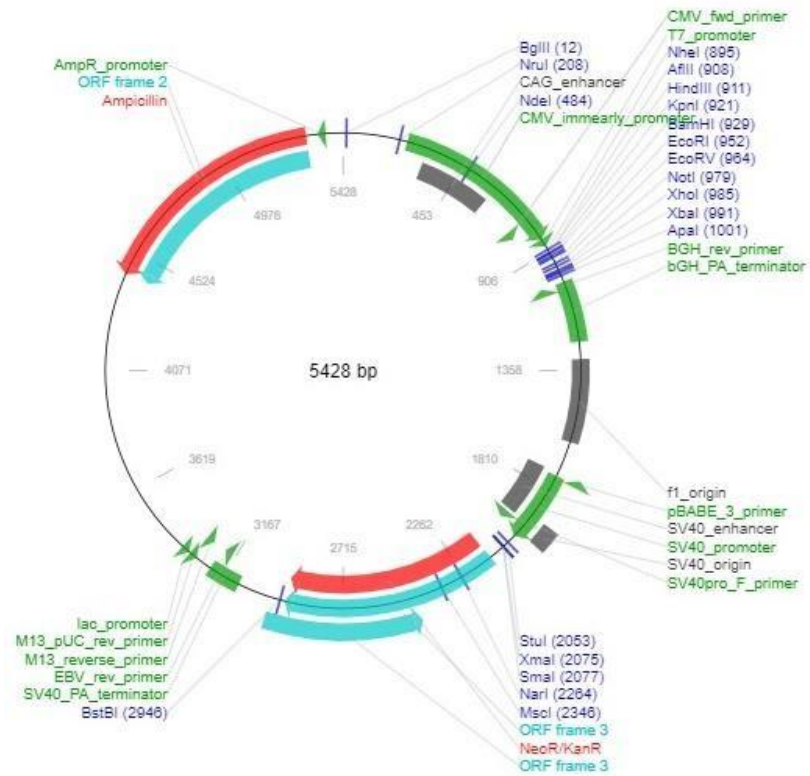


Figura 10: Mapa de restricción de vector pcDNA3.1(+). Este vector posee un tamaño de 5,3 kb. El pcDNA3.1(+) posee un gen de resistencia a ampicilina para seleccionar bacterias transformadas (Invitrogen Corporation).

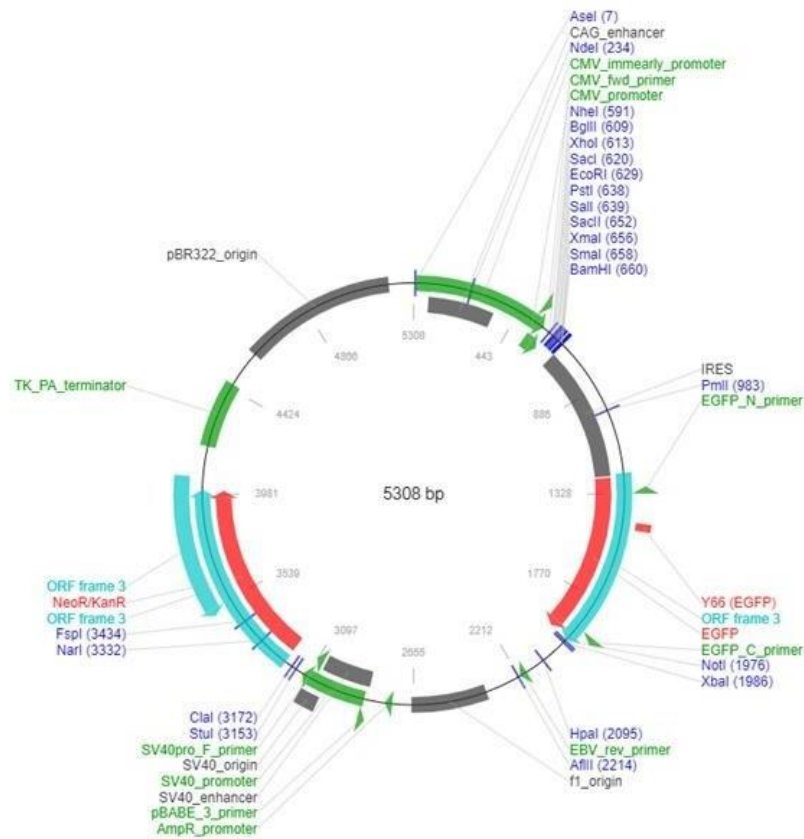


Figura 11: Mapa de restricción de vector pIRES2-EGFP. Este vector posee un tamaño de 5,3 kb y contiene el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) del virus de encefalomiocarditis (EMCV) entre el sitio de multiclonamiento (MCS) y la región codificante para EGFP. Esto permite que tanto el gen de interés (clonado en el MCS) como el gen que codifica para EGFP se traduzcan desde un mRNA bicistrónico sencillo. El MCS se encuentra entre el promotor temprano de citomegalovirus (CMV) y la secuencia IRES. El pIRES2-EGFP posee un gen de resistencia a kanamicina para seleccionar bacterias transformadas (Clontech Laboratories, Inc.).

2. Registros electrofisiológicos en modalidad célula completa

Los registros electrofisiológicos fueron realizados en modalidad “Whole Cell” siguiendo el protocolo de Moraga Cid et al., 2020.

La solución externa en la cual fueron registradas las células estuvo compuesta de: 150mM NaCl, 5.4mM KCl, 2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 10mM

glucosa, 10mM HEPES. La solución fue ajustada a pH 7,4 y a una osmolaridad entre 320-330 mOsm, almacenado a 4°C hasta el momento de utilización.

La solución interna estuvo compuesta por: 120 mM CsCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM ATP-Na₂, 10 mM BAPTA, 0.5 mM GTP y 10 mM HEPES. La solución fue ajustada a un pH 7,40 – 7,45 y a una osmolaridad de 290-310 mOsm almacenada a -20 °C hasta el momento de su utilización.

La solución “stock” de glicina de 10 mM fue preparada utilizando glicina hidrocloreuro (Sigma).

Las pipetas de registro fueron construidas con capilares de borosilicato (Sutter Instrument Company) con un puller de pipetas (Narishige Group) y una microforja (Narishige Group) para obtener pipetas de resistencia 5-7 MΩ para el modo de célula completa.

Se incorporó la solución interna a la micropipeta y se conectó al electrodo de registro de plata recubierto con AgCl. Se utilizó un microscopio invertido (Diaphot, Nikon, Japan) acoplado a una unidad de fluorescencia. Las células positivamente transfectadas se identificaron mediante la emisión de fluorescencia por la expresión de GFP utilizando filtros para FITC en el microscopio.

El potencial de membrana fue fijado a -60 mV y la corriente se filtró a 2 kHz. Se aplicó el agonista; glicina, mediante una línea de perfusión doble, la cual fue ubicada aproximadamente a 50 μM de la célula. Las concentraciones de glicina utilizadas fueron de: 10 μM; 30 μM; 60 μM; 100 μM; 300 μM; 500 μM; 1000 μM de glicina, las cuales fueron aplicadas durante 4 segundos para realizar los registros de corriente evocada. Las corrientes evocadas por glicina fueron registradas con un amplificador Axopatch 200B, una Digidata 13222A y el programa pClamp 9 (Molecular Devices, USA) y los datos obtenidos se guardaron utilizando un computador conectado al sistema y el análisis de los registros fue realizado utilizando el programa Clampfit 10.0 (Molecular Devices, USA).

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

$$I_{gli} = I_{m\acute{a}x} \frac{[gli]^{nh}}{[gli]^{nh} + [EC_{50}]^{nh}}$$

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

Finalmente, se evaluaron cambios en las corrientes máximas de R $Gli \alpha_3$ (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.

3. Registros electrofisiológicos de canal único

Los registros electrofisiológicos fueron realizados en modalidad “Cell-Attached” siguiendo el protocolo de Moraga Cid et al., 2020.

La solución externa en la cual fueron registradas las células estuvo compuesta de: 150mM NaCl, 2mM KCl, 2mM CaCl₂, 1,2mM MgCl₂, 10mM HEPES, 20mM TEA, 15mM Sucrosa, 14mM Glucosa. La solución fue ajustada a pH 7,4 y a una osmolaridad entre 350-370 mOsm, almacenado a 4°C hasta el momento de utilización.

La solución “stock” de glicina de 10mM fue preparada utilizando glicina hidrocloreto (Sigma). La solución que se incorporó a la micropipeta es una solución de glicina o una solución de glicina y estriknina según sea el caso y se conecta al electrodo de registro de plata recubierto con AgCl. Se utilizó un microscopio invertido (Diaphot, Nikon, Japan) acoplado a una unidad de fluorescencia. Las células positivamente transfectadas se identificaron mediante la emisión de fluorescencia por la expresión de GFP o mCherry, según corresponda, utilizando filtros para FITC en el microscopio.

Las pipetas de registro fueron construidas con capilares de borosilicato (Sutter Instrument Company) con un puller de pipetas (Narishige Group) y

una microforja (Narishige Group) para obtener pipetas de resistencia 9-12 MΩ para el modo de Cell-Attached

El potencial de membrana fue fijado a +60 mV y la corriente se filtró a 10kHz. Se aplicó el agonista Glicina en una concentración de 100 μM en la pipeta o una concentración de 1 μM de estricnina. Las corrientes evocadas por glicina fueron registradas con un amplificador Axopatch 200B con un filtro low-pass de 5kHz, un Digidata 13222A y el programa pClamp (Molecular Devices, USA) y los datos obtenidos se guardaron utilizando un computador conectado al sistema y el programa computacional Clampex versión 9.2.009.

La estimulación óptica de bPAC se realizó utilizando un LED acoplado a fibra que emite luz azul (470 nm) y un controlador LED T-Cube (Thorlabs, EE. UU.). Los registros realizados con bPAC se obtuvieron manteniendo la luz azul a aproximadamente a 200μm de la célula por 15 min.

La amplitud de las corrientes fue obtenida y analizada a través del programa Clampfit 10.7.0.3. El parámetro de la conductancia de las corrientes se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Amplitud de las corrientes}}{60mV} \cdot 1000$$

4. Inmunocitoquímica:

Para realizar los estudios de inmunocitoquímica las células HEK 293 fueron transfectadas con 24h de anticipación y guardadas en una incubadora termo regulada con 5% de CO₂ a 37°C.

Se quitó el medio D-MEM y el FBS (suero fetal de bovino) en el que estaban las células y se lavó 3 veces por 3 min con PBS 1X (buffer de fosfato salino), utilizando pipetas Pasteur. Se realizó la fijación de las células con PFA (paraformaldehído) al 4% con 500μl por vidrio por 7 min. Luego, se lavó con

PBS 3 veces por 3 min para enseguida realizar el proceso de bloqueo por 30min a 1 hora, con una solución compuesta con: PBS 1X y HS (suero de caballo) en una concentración de 1:10. Posteriormente, se incubó en una cámara húmeda con el anticuerpo primario contra 6xHis, ratón (Clontech) en una concentración de 1:100 por 1h o toda la noche según corresponda. Se lavó con PBS 1X por 3 min 3 veces.

Luego, se incubó sin luz con el anticuerpo secundario Cy3 anti-ratón (Jackson Immuno Research Laboratories, USA) en una concentración de 1:200 por 1 hora o toda la noche según corresponda.

Para finalizar, se lavó nuevamente con PBS 1X 3 veces por 3 min para comenzar con el proceso de montaje, en el que se utilizó de 8 a 10µl de DAKO (Fluorescence 17 Mounting Medium, Dako Cytomation Dako, USA) para colocar los vidrios en los portaobjetos. Se deja secar por mínimo 2 a 4 horas y se guardaron a 4°C por 3 a 6 meses máximo.

5. Análisis estadísticos:

Para estudios de inmunocitoquímica las comparaciones estadísticas (Lara, C.O., et al., 2016) serán realizadas con ANOVA, en los cuales un $p < 0.05$ se considerará estadísticamente significativo. Las muestras obtenidas de los estudios de inmunocitoquímica fueron analizadas en un microscopioconfocal espectral modelo Zeiss LSM700 (Centro de Microscopia Avanzada, CMA, UdeC). Las imágenes fueron captadas en 2 canales (rojo 488nm y verde 550nm) y se analizaron planos de 1 µm en el eje z de cada célula. El análisis de co-localización fueron realizados a través del análisis *off-line* de las imágenes de inmunocitoquímica obtenidas mediante microscopía confocal usando el programa FIJI.

Las corrientes evocadas fueron cuantificadas con el software de análisis electrofisiológico ClampFit 10.7.0.3. (Axon Instruments). Para realizar los análisis estadísticos y gráficos resumen se utilizó el programa Origin 6.0 (Microcal, USA) donde los valores $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos mediante test t-Student. Además, en los

gráficos los valores expuestos fueron expresados como el promedio \pm error estándar.

Resultados

1. Efectos de la activación de PKA mediante la incubación con 8-br- cAMP en los patrones de expresión en la superficie de la membrana del RGLi α_3K WT mediante inmunocitoquímica en células HEK293

Con el objetivo de evaluar si la disminución de la función del RGLi variante α_3K se encuentra asociada a un cambio en el patrón de expresión del receptor a nivel de la membrana tras la incubación con 8-br-cAMP, realizamos estudios de inmunocitoquímica y microscopia confocal en células HEK293 en las siguientes condiciones: 1) α_3K WT del RGLi + DMSO, 2) α_3K WT del RGLi + 8-br-cAMP, 3) α_3K S346E del RGLi, 4) α_3K S346A del RGLi + DMSO, 5) α_3K S346A del RGLi + 8-br- cAMP.

El 8-br-cAMP es un análogo no hidrolizable de cAMP y fue utilizado mediante incubaciones de 30 min en el medio para realizar una estimulación química directa de PKA e identificar si dicha activación muestra un impacto en los patrones de expresión en la membrana de las variantes α_3K WT del RGLi y α_3K S346A del RGLi, en comparación a la expresión de la mutación fosfomimética; α_3K S346E.

Nuestros resultados mostraron que la expresión del RGLi α_3K WT tras la incubación con el AMPc no hidrolizable (8-br-cAMP) no muestra cambios significativos en los patrones de expresión de membrana comparados con α_3K S346A y la mutación fosfomimética α_3K S346E. Por lo que, la disminución de las corrientes glicinérgica del RGLi variante α_3K WT no se debe a un cambio en los patrones de expresión en la membrana.

Finalmente, la inmunoreactividad observada en el RGLi α_3K WT y RGLi α_3K S346E muestra la expresión de ambos receptores en células HEK293, lo cual se puede corroborar con las corrientes registradas mediante electrofisiología. (**Figura 12**)

Patrones de expresión de la variante $\alpha 3K$ del RGlI

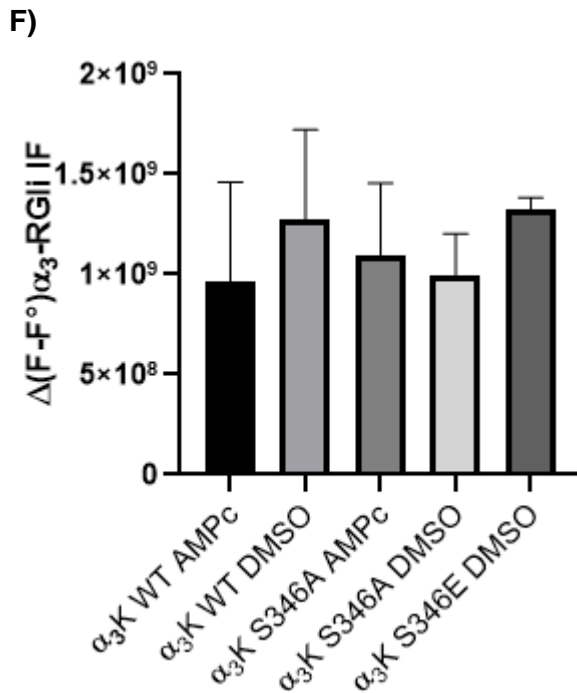
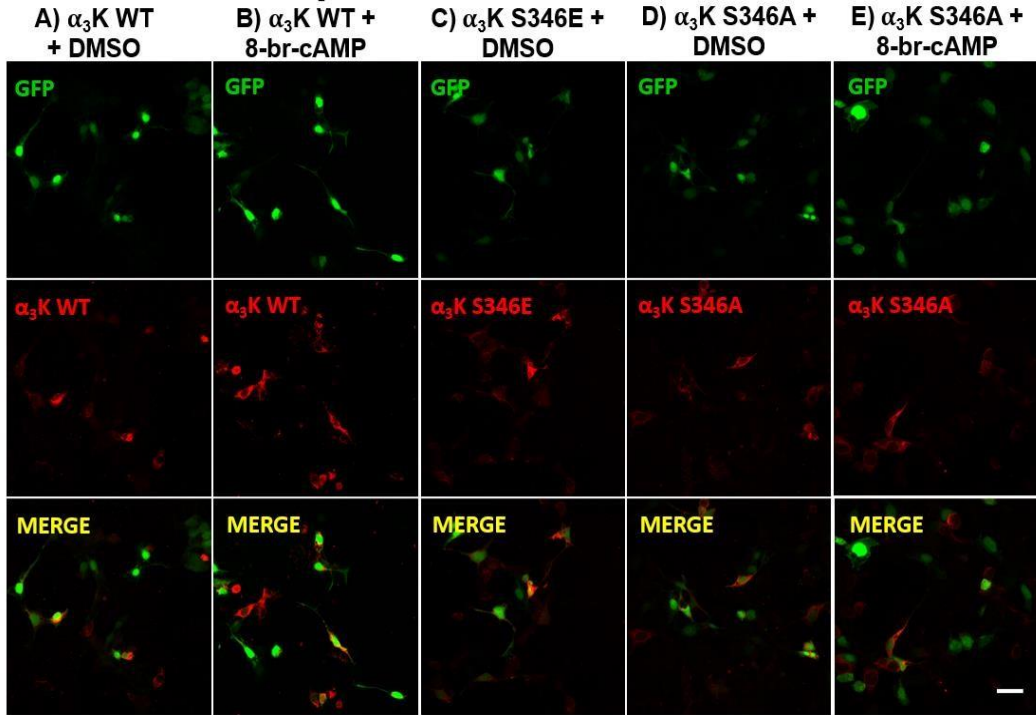


Figura 12: Imágenes de inmunocitoquímica adquiridas con microscopia confocal de la $\alpha 3K$ WT, $\alpha 3K$ S346E y $\alpha 3K$ S346A. En el canal verde se observa GFP, en el canal rojo se observa el RGlI y en amarillo se encuentra elMERGE que es la superposición de los 2 canales (40X) A) Expresión del receptor $\alpha 3K$ Wild-Type

en células HEK293 con el vehículo que es DMSO. **B)** Expresión del receptor α_3K Wild-Type en células HEK293 incubadas con 8- br-cAMP. **C)** Expresión del receptor α_3K con la mutación fosfomimética (S346E) en células HEK293 con el vehículo DMSO. **D)** Expresión del receptor α_3K S346A en células HEK293 incubadas con el vehículo DMSO. **E)** Expresión del receptor α_3K S346A en células HEK293 con DMSO. **F)** Cuantificación de los estudios de inmunocitoquímica en las 3 condiciones mencionadas anteriormente y sus respectivos controles.

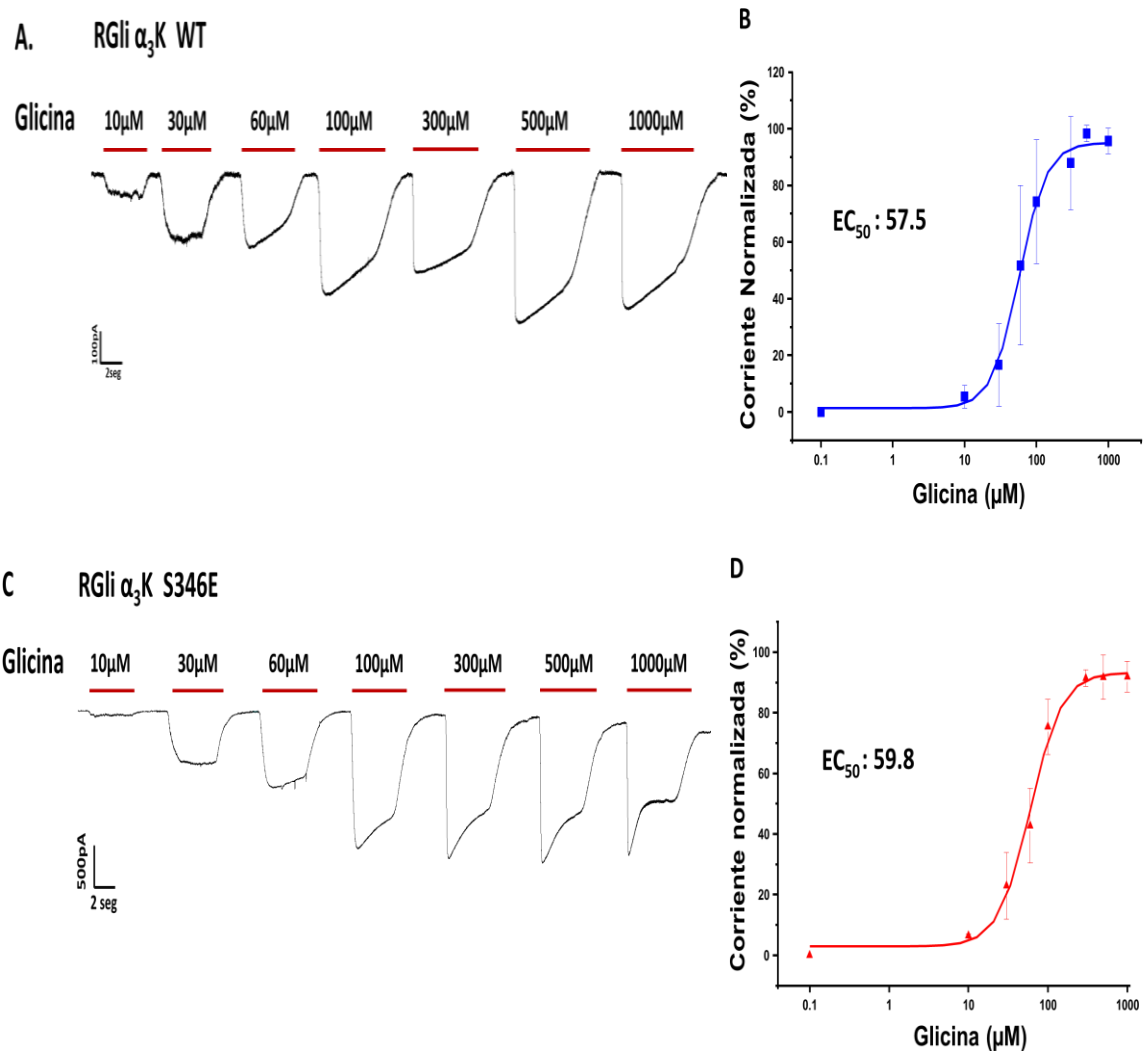
2. Estudio de los parámetros macroscópicos (EC_{50} , $I_{m\acute{a}x}$) de RGLi α_3KWT y RGLi α_3K S346E en células HEK293

Estudios previos han mostrado que la fosforilación del residuo Serina 346 en el receptor de glicina variante α_3L presente en el ICD, produce una reducción en la afinidad aparente del receptor por su agonista, lo que podría explicar la inhibición de las corrientes activas por glicina luego de un evento de fosforilación. (Harvey, R. J. et.al, 2004) (Moraga et. al., 2020).

Con el fin de evaluar si en la variante α_3K del RGLi ocurre un mecanismo similar al que ocurre en la variante α_3L frente a una fosforilación anteriormente mencionado, se estudio con una mutación fosfomimética de la variante α_3K cambios en los parámetros macroscópicos (EC_{50} , $I_{m\acute{a}x}$). Para esto hemos realizado estudios electrofisiológicos con la técnica de Whole- Cell en células HEK293 tranfectadas con α_3K WT o α_3K S346E con concentraciones crecientes de glicina (10 μM , 30 μM , 60 μM , 100 μM , 300 μM , 600 μM , 1000 μM) (**Figura 13A**, **Figura 13C**) para observar los cambios en la afinidad aparente del receptor por su ligando.

Los análisis de las curvas concentración-respuesta mostraron que la variante α_3K WT no presenta diferencias significativas en la afinidad aparente del receptor con su ligando, al igual que la variante fosfomimética α_3K S346E, lo que se puede ver reflejado en las gráficas de corrientes normalizadas, ya que la mutación fosfomimética no produce un desplazamiento de la curva. (EC_{50} α_3K WT = 57.5 $\mu M \pm 3.8$, $n=8$; **Figura 13B** y EC_{50} α_3K S346E = 59.8 μM

± 5.1 , $n=6$; **Figura 13 D**). En términos de corrientes máximas, los resultados obtenidos desde células HEK293 que expresaron el receptor α_3K WT silvestre ($n=8$) o el receptor α_3K S346E ($n=6$), mostraron diferencias significativas entre la variante silvestre y la variante fosfomimética del RGl α_3K . Sin embargo, estos resultados no fueron normalizados con la capacitancia celular, por lo que no se ha tomado en cuenta el tamaño de las células registradas y la cantidad de receptor expresado en ellas. (**Figura 13E, Figura 13F**)



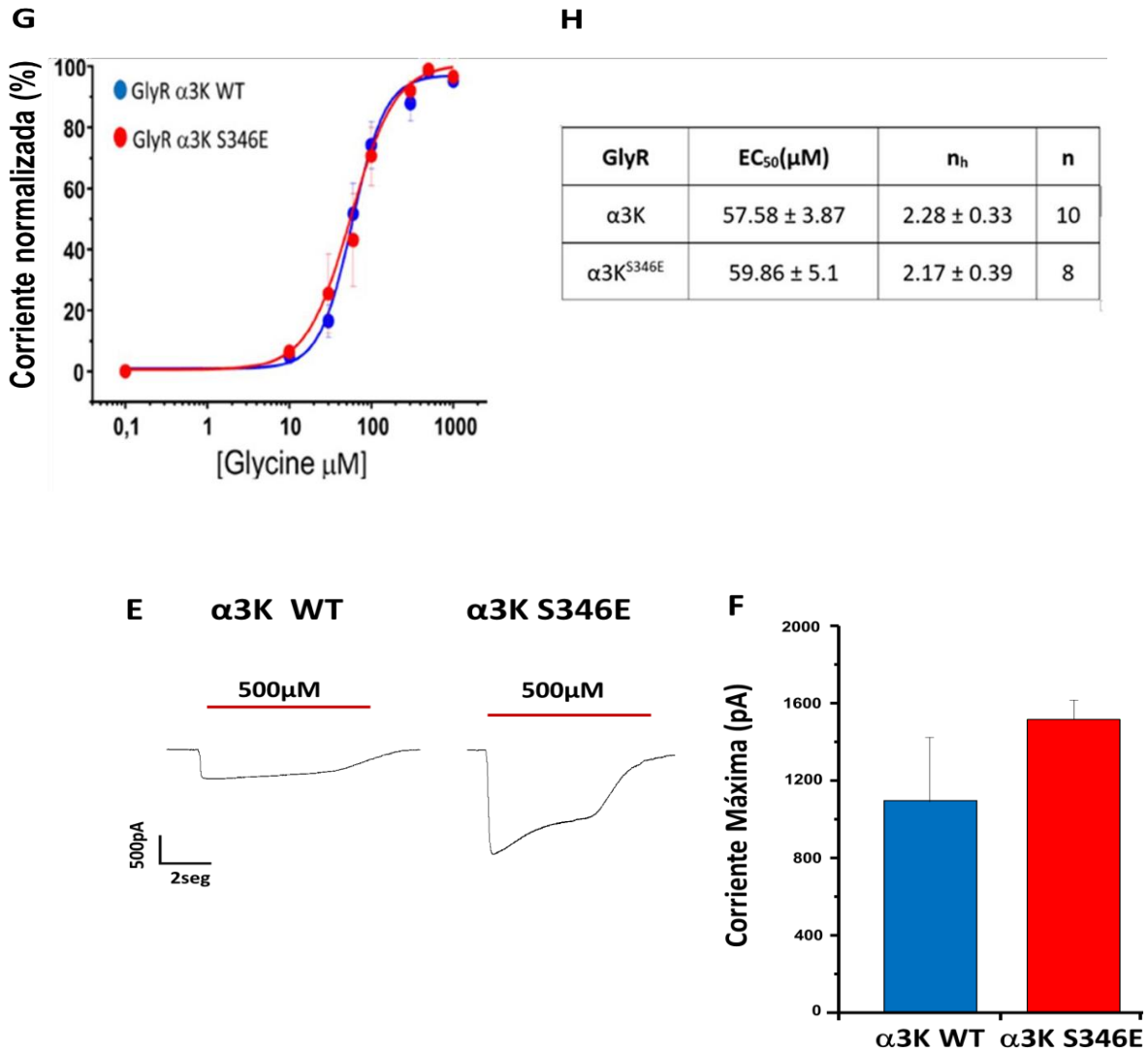


Figura 13: Registros electrofisiológicos a través de la técnica de Whole Cell en células HEK293 transfectadas con la variante $\alpha 3K$ WT y $\alpha 3K$ S346E. A) Curvas realizadas con concentraciones crecientes de glicina (10 μM , 30 μM , 60 μM , 100 μM , 300 μM , 500 μM , 1000 μM) en células HEK293 transfectadas con el receptor de glicina $\alpha 3K$ Wild-Type registradas con la técnica de Whole-Cell en (n=8). B) Curva Concentración – Respuesta de las corrientes evocadas por glicina en $\alpha 3K$ Wild-Type. C) Curvas realizadas con concentraciones crecientes de glicina (10 μM , 30 μM , 60 μM , 100 μM , 300 μM , 500 μM , 1000 μM) en células HEK293 transfectadas con el receptor de glicina $\alpha 3K$ S346E registradas con la técnica de Whole-Cell (n=6). D) Curva Concentración – Respuesta de las corrientes evocadas por glicina en $\alpha 3K$ S346E. E) Corrientes máximas evocadas con 500 μM de las variante $\alpha 3K$ Wild-Type y $\alpha 3K$ S346E. F) Gráfico de barras de las corrientes máximas de ambas variantes WT y fosfomimética.

3. Estudio de los parámetros cinéticos microscópicos de RGli α_3K WT y RGli α_3K S346E en células HEK293 mediante técnicas electrofisiológicas

La evidencia experimental ha demostrado que la reducción en la función del RGli α_3L por eventos de fosforilación mediada por PKA, puede ser explicada por una reducción significativa de la conductancia unitaria del canal. Un estudio reciente, ha demostrado que existen diferencias en las conductancias unitarias de ambas variantes, presentando la variante α_3K una mayor conductancia que la variante α_3L (~105 vs 69 pS respectivamente) (Lemmens V, et al., 2021). Cabe destacar que existen discrepancias en las conductancias unitarias reportadas por diferentes laboratorios. En el caso de nuestro laboratorio, la variante α_3L del RGli presenta una conductancia de 92pS. De manera interesante, los eventos de fosforilación reducen la conductancia de la variante α_3L de 92pS a 62pS. (Moraga Cid G, et al., 2020)

Ahora, con el fin de evaluar si en la variante α_3K del RGli ocurre un mecanismo similar al que ocurre en la variante α_3L frente a una fosforilación, se realizaron registros electrofisiológicos de la variante α_3L WT y α_3L fosfomimético (S346E) con la técnica de Cell Attached con 100 μ M de glicina (**Figura 14A, Figura 14B, Figura 14C**). Y se observó que ocurre una disminución significativa de la amplitud de las corrientes del RGli α_3L fosfomimético (S346E) de 5.3 pA a 3.0 pA, de igual manera, se observó una disminución de la conductancia unitaria del canal, siendo 90pS para α_3L WT del RGli y 60pS para α_3L S346E (**Figura 14D, Figura 14E, Figura 14F**)

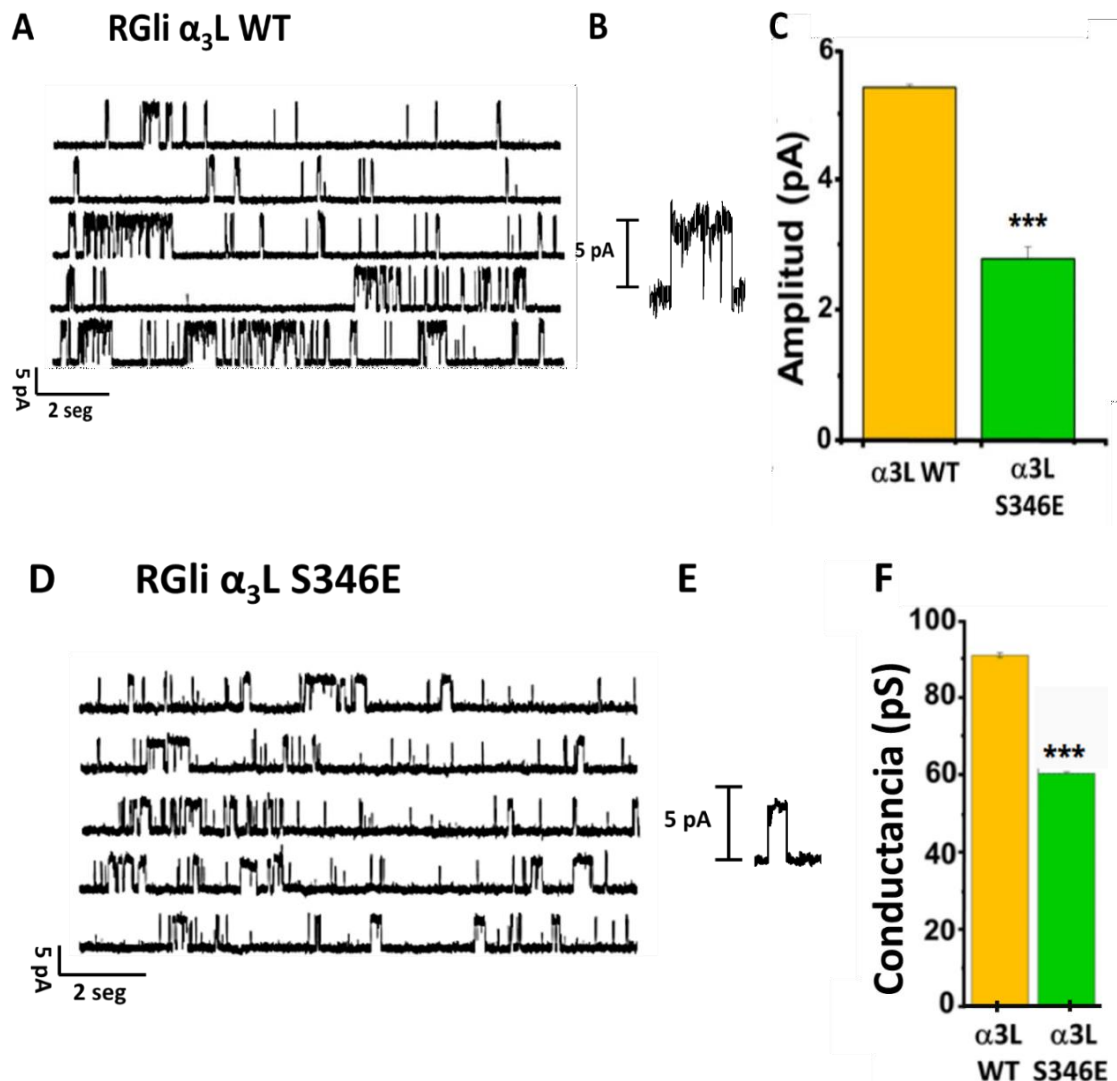


Figura 14: Registros electrofisiológicos a través de la técnica de Cell-Attached en células HEK293 transfectadas con la variante α_3L WT y α_3L S346E. A) Registros electrofisiológicos con la técnica de Cell-Attached en células HEK293 transfectadas con el receptor de glicina α_3L Wild-Type. **B)** Actividad registrada de con el receptor de glicina α_3L Wild-Type con $100 \mu\text{M}$ de glicina. **C)** Gráfico de barras de las amplitudes de las corrientes de ambas variantes WT y fosfomimética. **D)** Registros electrofisiológicos con la técnica de Cell-Attached en células HEK293 transfectadas con el receptor de glicina α_3L S346E. **E)** Actividad registrada de con el receptor de glicina α_3L S346E con $100 \mu\text{M}$ de glicina. **F)** Gráfico de barras de las conductancias de ambas variantes WT y fosfomimética.

A partir de los resultados obtenidos en la variante α_3L WT y α_3L fosfomimético (S346E), quisimos evaluar si la variante α_3K del RGLi se comportaba de la misma manera frente a una fosforilación. Se realizaron registros electrofisiológicos de la variante α_3K WT y α_3K fosfomimética con latécnica de Cell Attached con 100 μ M de glicina (**Figura 15A, Figura 15B, Figura 15C**). Y se observó que ocurre una disminución significativa tanto de la amplitud de las corrientes de 5.8 pA a 2.9 pA, de igual manera, se observó una disminución de la conductancia unitaria del canal, siendo 95pS para α_3K WT del RGLi (n=10) y 50pS para α_3K S346E (n=16) (**Figura 15D, Figura 15E, Figura 15F**)

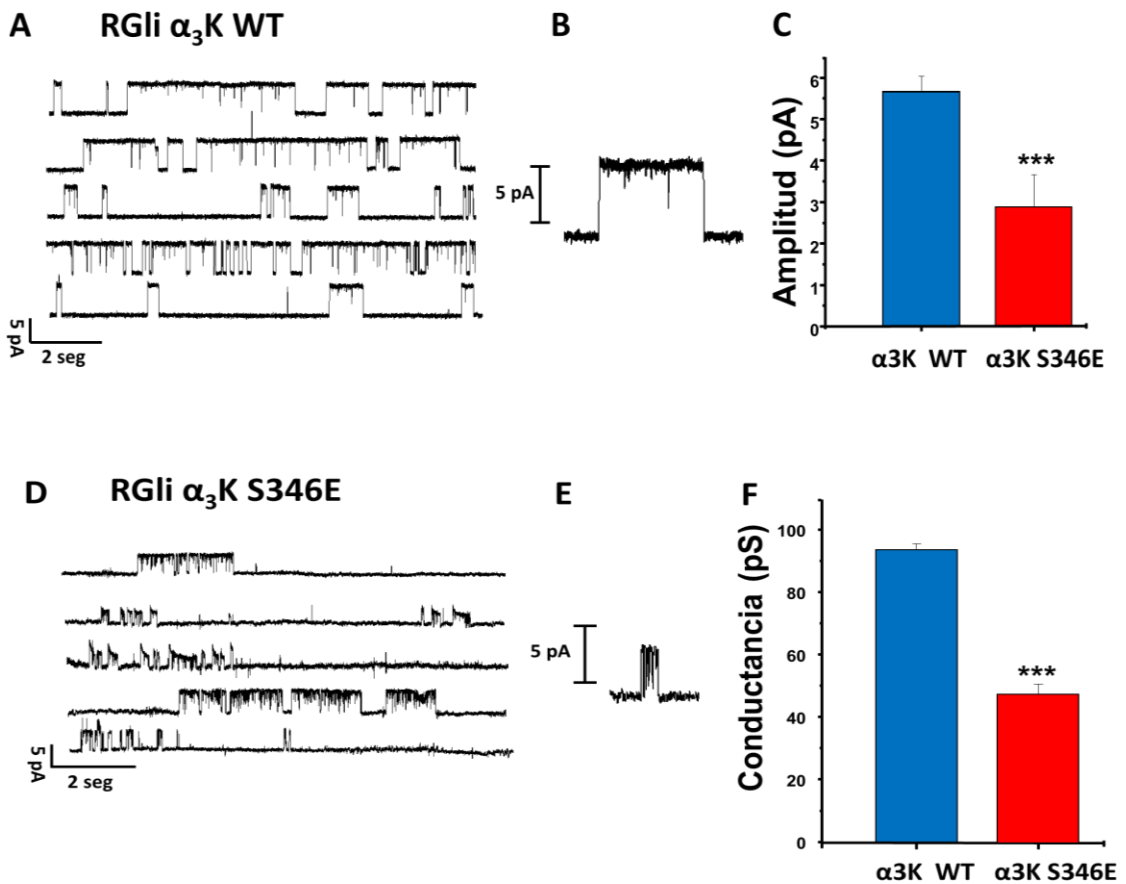


Figura 15: Registros electrofisiológicos a través de la técnica de Cell attached en células HEK293 transfectadas con la variante α_3K WT y α_3K S346E. **A)** Registros electrofisiológicos con la técnica de Cell-Attached en células HEK293 transfectadas con el receptor de glicina α_3K Wild-Type ($n=10$). **B)** Actividad registrada de con el receptor de glicina α_3K Wild-Type con $100\mu M$ de glicina. **C)** Gráfico de barras de las amplitudes de las corrientes de ambas variantes WT y fosfomimética. **D)** Registros electrofisiológicos con la técnica de Cell-Attached en células HEK293 tranfectadas con el receptor de glicina α_3K S346E ($n=16$). **E)** Actividad registrada de con el receptor de glicina α_3K S346E con $100\mu M$ de glicina. **F)** Gráfico de barras de las conductancias de ambas variantes WT y fosfomimética.

3.1 Efectos de la activación de bPAC en la variante α_3K WT mediante electrofisiología en Cell-Attached

La evidencia experimental ha demostrado que el RGLi α_3 juega un rol importante en la generación de procesos de dolor crónico (Acuña M, et al., 2016). Estos eventos son mediados por una reducción de la función del RGLi α_3 por procesos de fosforilación mediada por PKA. La fosforilación del residuo S346, localizado en el ICD de la variante α_3L , produce una disminución significativa de la conductancia unitaria del canal (Moraga Cid G, et al., 2020). Sin embargo, aun cuando ambas variantes pueden ser coexpresadas en un mismo pentámero, el impacto de la fosforilación en la variante α_3K aun no habia sido estudiada. Por este motivo, realizamos registros de *Cell-Attached* en celulas HEK293 tranfectadas con α_3K WT + bPAC con $100\mu M$ de glicina y se observó que al activar la luz azul, ocurre una disminución en la amplitud de las corrientes de 6.0 pA a 1.5 pA luego de 15 min . (**Figura 16**)

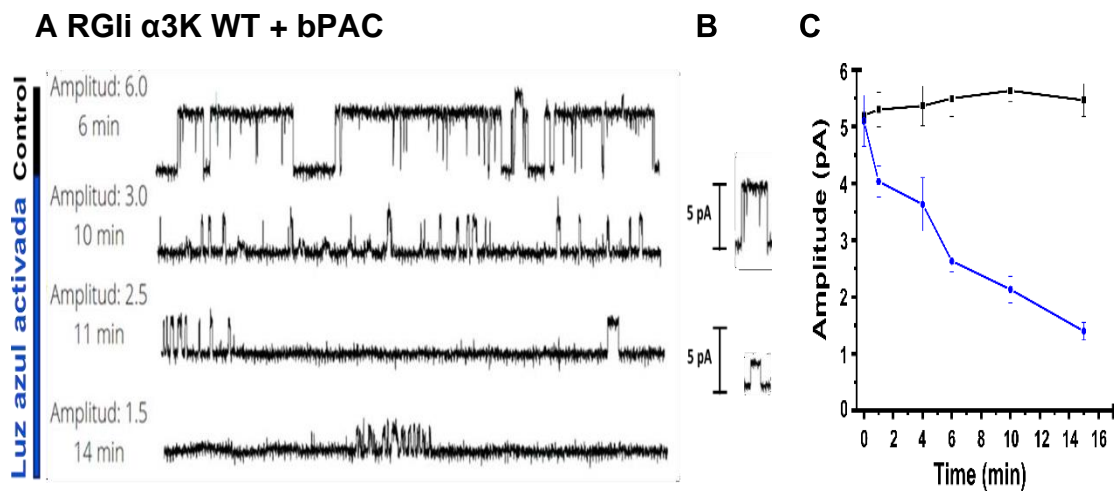


Figura 16: Registros electrofisiológicos a través de la técnica de Cell Attached en células HEK293 transfectadas con la variante $\alpha 3K$ WT + bPAC. A) Registros electrofisiológicos con la técnica de Cell-Attached en células HEK293 cotransfectadas con el receptor de glicina $\alpha 3K$ Wild-Type y bPAC. La luz azul que activa bPAC se mantuvo prendida por 15min ($n=3$). B) Amplitud registrada del RGLi $\alpha 3K$ WT con 100 μ M de glicina y bPAC. C) Curso temporal de corrientes evocadas por glicina (100 μ M) en ausencia y presencia de luz azul en células que coexpresan $\alpha 3K$ RGLi y bPAC.

3.2 Efectos de un 2,6-DTBP en la mutación fosfomimética de $\alpha 3K$ mediante electrofisiología en Cell-Attached.

Estudios anteriores han demostrado que el 2,6-DTBP, que es un derivado no anestésico del Propofol, revierte la desinhibición mediada por la inflamación a través de una interacción específica con los RGLi heteroméricos que contienen la subunidad $\alpha 3$ fosforilada (Acuña M, et al., 2016). De manera interesante, pudimos observar que al co-aplicar glicina + 10 μ M de 2,6-DTBP se restaura la amplitud de las corrientes glicinérgicas y la conductancia unitaria generadas por la variante fosfomimética $\alpha 3K$ S346E. Obteniendo un valor control de la amplitud del RGLi $\alpha 3K$ S346E de 3.0 pA y una conductancia unitaria de 50 pS (**Figura 17A, Figura 17B, Figura 17C**). Del mismo modo, se observó la variante fosfomimética del RGLi $\alpha 3K$ S346E con la co-aplicación de 2,6-

DTBP (n=6) y se muestra una restauración de la amplitud inicial a 6.0 pA y una conductancia unitaria de 95 pS, siendo similar a los datos obtenidos anteriormente en la variante α_3K WT (**Figura 17D, Figura 17E, Figura 17F**).

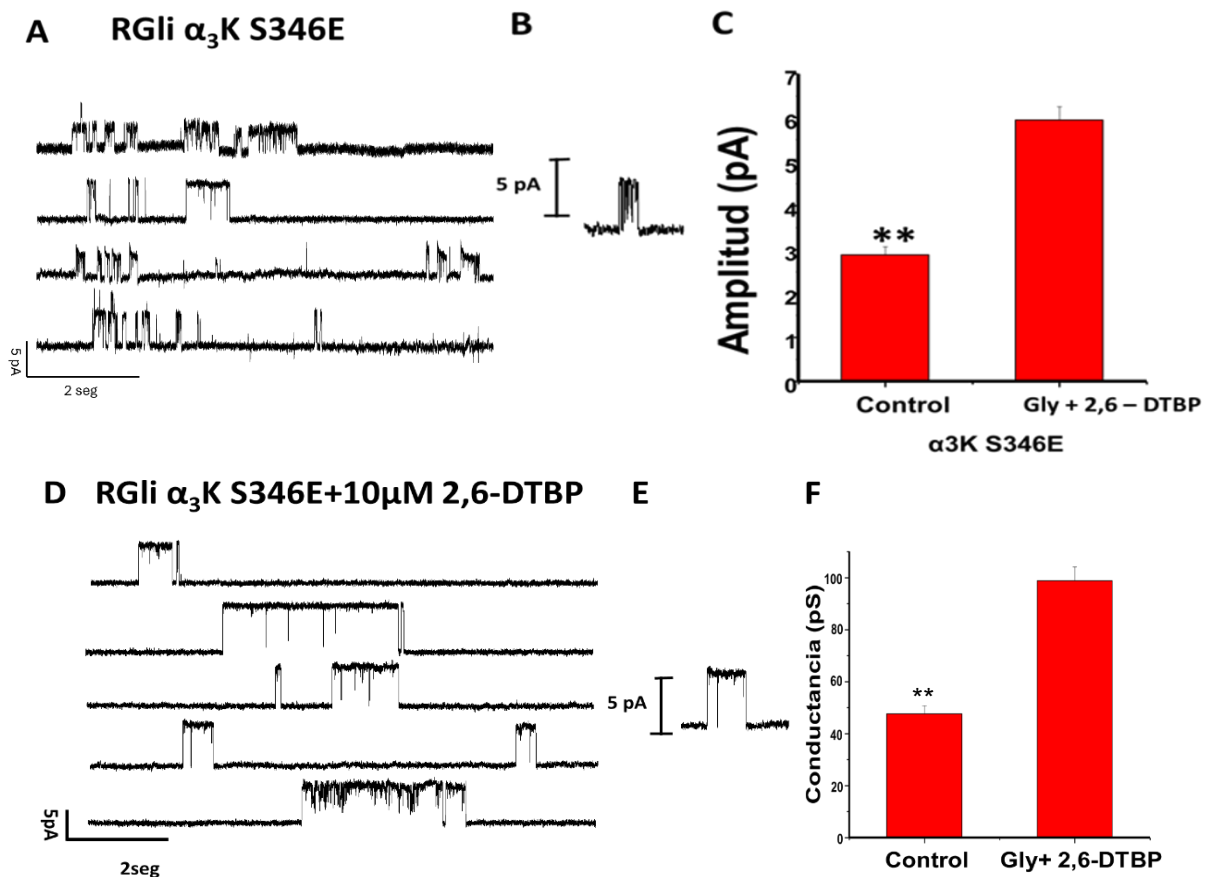


Figura 17: Registros electrofisiológicos a través de la técnica de Cell-attached en células HEK293 transfectadas con la variante α_3K WT. A) Registros electrofisiológicos con la técnica de Cell-Attached en células HEK293 transfectadas con el receptor de glicina α_3K S346E utilizando 100 μM de glicina. **B)** Actividad registrada de con el receptor de glicina α_3K S346E con 100 μM de glicina. **C)** Gráfico de barras de las amplitudes de las corrientes control, evocadas con 100 μM de glicina de glicina + 10 μM de 2,6-DTBP. **D)** Registros electrofisiológicos con la técnica de Cell- Attached en células HEK293 tranfectadas con el receptor de glicina α_3K . S346E utilizando 100 μM de glicina + 10 μM de 2,6-DTBP **E)** Actividad registrada de con el receptor de glicina α_3 S346E con 100 μM de glicina + 10 μM de 2,6-DTBP **F)**

Gráfico de barras de las conductancias de las corrientes control, evocadas con 100 μ M de glicina y 100 μ M de glicina + 10 μ M de 2,6- DTBP.

Discusión

Las prostaglandinas de tipo 2 (PGE2) son un mediador crucial de la sensibilización al dolor inflamatorio crónico. Estudios previos realizados en neuronas de la asta dorsal de ratones han determinado que la aplicación de PGE2 provoca una disminución en las corrientes sinápticas espontáneas glicinérgicas inhibitorias (glicina-IPSCs) y no en las corrientes evocadas por GABA o Glutamato. En esta misma línea, se identificó a través de péptidos inhibidores de proteínas quinasa, que la PKA era la involucrada en la cascada de señalización que provocaba la disminución de las corrientes glicinérgicas (Ahmadi, S., et al., 2001).

Estudios realizados en ratones knockout para α_3 , que carecen de la inhibición de la neurotransmisión glicinérgica por PGE2 que se observa en los ratones silvestres, se observó que la subunidad α_3 del RGLi es esencial en el proceso de sensibilización al dolor. De igual manera, se observó que la fosforilación de PKA es realizada en el residuo serina 346 presente en el ICD de la subunidad (Harvey, R. J., et al., 2004).

Sin embargo, la subunidad α_3 del RGLi como mencionamos anteriormente presenta dos variantes; α_3L y α_3K , que se ha observado presentan diferencias tanto en los patrones de expresión como en parámetros macro y microscópicos. (Eichler et al., 2009; Breitinger, et al., 2002; Lemmens, et al., 2021). Estudios experimentales de inmunofluorescencia en neuronas hipocámpales de ratón, han propuesto que la variante α_3L del RGLi presenta un patrón de expresión en la membrana diferente, al que presenta la variante α_3K del RGLi. El patrón de expresión de la variante α_3L forma agrupaciones o clusters a diferencia de la variante α_3K que se distribuye de manera homogénea en la membrana (Eichler et al., 2009). Estudios experimentales en la variante α_3L , que activaron de forma directa e indirectamente PKA, observaron que no hay diferencias significativas en los patrones de expresión en la membrana de la variante α_3L cuando estaba fosforilada. (Moraga Cid et al., 2020).

De igual manera, un estudio realizado en células HEK293 con altas concentraciones de glicina; 2 mM, permitió observar que la velocidad de desensibilización es mayor en el RGli α_3 K que en el RGli α_3 L (Breitinger, et al., 2002). Así mismo se observó que la conductancia unitaria de ambas variantes era diferente. Además, mostraron que el RGli α_3 K se desensibiliza en un mayor porcentaje en la corriente activada por glicina comparada con el RGli α_3 L. (Breitinger, et al., 2002).

Así mismo, un reciente estudio realizado en células HEK293 que expresaban al RGli α_3 L muestra que al activar PKA de forma indirecta; EP2-R y bPAC y de forma directa; 8-Br-AMPC, el RGli α_3 L muestra una disminución de las corrientes glicinérgicas, tanto en la técnica de *whole-cell* como en *cell-attached* permitiéndonos observar que la amplitud de las corrientes y la conductancia unitaria de esta variante disminuye notablemente (Moraga-Cid et al., 2020).

Nuestros experimentos de inmunocitoquímica y microscopia confocal realizados en células HEK293 que expresaban el RGli α_3 K mostraron que la activación de PKA a través de un AMPc no hidrolizable (8-br-cAMP) no mostro cambios significativos en los patrones de expresión en la membrana del receptor. De igual manera, los estudios realizados con la mutación fosfomimética no presentaron cambios significativos en los patrones de expresión del receptor. En consecuencia, y luego de descartar cambios en la expresión en la disminución de las corrientes glicinérgica cuando se activa PKA, se realizaron estudios de EC_{50} y corrientes máximas al RGli α_3 K y una mutante fosfomimética de esta variante. Estos estudios mostraron que la EC_{50} del RGli α_3 K y RGli α_3 K S346E son muy similares y, por lo tanto, la mutación fosfomimética no muestra una pérdida de afinidad aparente del receptor por su ligando. Sin embargo, las corrientes máximas del RGli α_3 K S346E es un 27% mayor que las corrientes máximas del RGli α_3 K WT. Es importante destacar que los datos no están normalizados a la capacitancia de la célula, por lo tanto, no fue considerada la superficie ni la expresión en esta área de receptores. No obstante, estos estudios fueron realizados en un

receptor que presentaba una modificación química en el ICD que simula una fosforilación. Por lo que, no es una fosforilación y pudiese presentar cambios en los resultados. De igual manera, las mutaciones fosfomiméticas son un modelo ampliamente utilizado para simular fosforilaciones.

Luego, realizamos estudios en los parámetros microscópicos del RGl α_3 K. Comparamos amplitud y conductancia unitaria del RGl α_3 K WT y RGl α_3 K S346E y se observó que en la variante que posee la mutación fosfomimética hubo una disminución de un 50 % en la amplitud y una disminución de un 52% en la conductancia unitaria del receptor, por lo que disminuye de forma significativa en comparación con el receptor silvestre en ambos parámetros. La mutación fosfomimética presento una amplitud promedio de 2.9 pA y una conductancia unitaria de 50pS.

De igual manera, se realizó un estudio en los parámetros microscópicos del receptor α_3 K WT con la adenilciclasa foto activable con luz azul; bPAC. Y se observó que al activar PKA mediante bPAC por 15 min, disminuye de forma paulatina la amplitud de las corrientes glicinérgicas del receptor α_3 K WT. Sin embargo, este experimento posee un n bajo por lo que requiere más repeticiones.

Finalmente, utilizamos un compuesto derivado del Propofol (2,6-DTBP) con el RGl α_3 K S346E y se observó que la co-aplicación de 10 μ M de 2,6-DTBP con 100 μ M glicina, restaura la amplitud de las corrientes de glicina de la variante que posee la mutación fosfomimética, es decir, actúa como modulador alostérico positivo.

Estos hallazgos permiten iniciar una serie de estudios farmacológicos con el receptor de glicina α_3 como objetivo prometedor en la terapia del dolor (Langlhofer, G. & Villmann, C. 2016).

Conclusiones

El RGli α_3 juega un rol crítico en la fisiología normal del SNC. Su mal funcionamiento ha estado ligado a la aparición de eventos patológicos como dolor crónico y epilepsia. El RGli α_3 presenta dos variantes producto de un proceso de empalme alternativo postraduccionales: α_3L y α_3K . Estas variantes presentan diferencias en sus patrones de expresión, localización subcelular, función y modulación por proteínas intracelulares. La evidencia experimental ha demostrado que el RGli α_3 juega un rol importante en la generación de procesos de dolor crónico. Estos eventos son mediados por una reducción de la función del RGli α_3 por procesos de fosforilación mediada por PKA. La fosforilación del residuo S346, localizado en el ICD de la variante α_3L , produce una disminución significativa de la conductancia unitaria del canal.

Nuestra evidencia experimental con el RGli α_3K nos permitió observar que la disminución de las corrientes glicinérgicas de esta variante debido a la activación de PKA, no es producto de un cambio en la expresión en la membrana ni la pérdida de afinidad aparente del receptor con su ligando, sino que es producto de una disminución en la amplitud de las corrientes y la conductancia unitaria del receptor. Y finalmente, en un modelo de fosforilación del RGli α_3K , esta disminución de amplitud de las corrientes y la disminución en la conductancia unitaria del canal puede ser restaurada por un PAM como el 2,6-DTBP.

Bibliografía

1. Acuña MA, Yévenes GE, Ralvenius WT, Benke D, Di Lio A, Lara CO, Muñoz B, Burgos CF, Moraga-Cid G, Corringier PJ, Zeilhofer HU. Phosphorylation state-dependent modulation of spinal glycine receptors alleviates inflammatory pain. *J Clin Invest*. 2016 Jul 1;126(7):2547-60. doi: 10.1172/JCI83817. Epub 2016 Jun 6. PMID: 27270175; PMCID: PMC4922714.
2. Ahmadi S, Lippross S, Neuhuber WL, Zeilhofer HU. PGE(2) selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons. *Nat Neurosci*. 2002 Jan;5(1):34-40. doi: 10.1038/nn778. PMID: 11740501.
3. Aguayo LG, van Zundert B, Tapia JC, Carrasco MA, Alvarez FJ. Changes on the properties of glycine receptors during neuronal development. *Brain Res Brain Res Rev*. 2004 Dec;47(1-3):33-45. doi: 10.1016/j.brainresrev.2004.06.007. PMID: 15572161.
4. Araya, A., Gallegos, S., Viveros, R., San Martín, L., Muñoz, B., Harvey, R. J., Zeilhofer, H. U., & Aguayo, L. G. (2021). Presence of ethanol-sensitive and ethanol-insensitive glycine receptors in the ventral tegmental area and prefrontal cortex in mice. *British Journal of Pharmacology*, 178(23), 4691–4707. <https://doi.org/10.1111/bph.15649>
5. Avila A, Nguyen L, Rigo JM. Glycine receptors and brain development. *Front Cell Neurosci*. 2013 Oct 21;7:184. doi: 10.3389/fncel.2013.00184. PMID: 24155690; PMCID: PMC3800850.
6. Avila A, Vidal PM, Dear TN, Harvey RJ, Rigo JM, Nguyen L. Glycine receptor $\alpha 2$ subunit activation promotes cortical interneuron migration. *Cell Rep*. 2013 Aug 29;4(4):738-50. doi: 10.1016/j.celrep.2013.07.016. Epub 2013 Aug 15. PMID: 23954789; PMCID: PMC3763372.
7. Bakker MJ, van Dijk JG, van den Maagdenberg AM, Tijssen MA. Startle syndromes. *Lancet Neurol*. 2006 Jun;5(6):513-24. doi: 10.1016/S1474-4422(06)70470-7. PMID: 16713923.

8. Bode A, Lynch JW. The impact of human hyperekplexia mutations on glycine receptor structure and function. *Mol Brain*. 2014 Jan 9;7:2. doi: 10.1186/1756-6606-7-2. PMID: 24405574; PMCID: PMC3895786.
9. Bregman H, Simard JR, Andrews KL, Ayube S, Chen H, Gunaydin H, Guzman-Perez A, Hu J, Huang L, Huang X, Krolikowski PH, Lehto SG, Lewis RT, Michelsen K, Pegman P, Plant MH, Shaffer PL, Teffera Y, Yi S, Zhang M, Gingras J, DiMauro EF. The Discovery and Hit-to-Lead Optimization of Tricyclic Sulfonamides as Potent and Efficacious Potentiators of Glycine Receptors. *J Med Chem*. 2017 Feb 9;60(3):1105-1125. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b01496. Epub 2016 Dec 21. PMID: 28001399.
10. Breitinger HG, Villmann C, Melzer N, Rennert J, Breitinger U, Schwarzingler S, Becker CM. Novel regulatory site within the TM3-4 loop of human recombinant alpha3 glycine receptors determines channel gating and domain structure. *J Biol Chem*. 2009 Oct 16;284(42):28624-33. doi: 10.1074/jbc.M109.043174. Epub 2009 Aug 6. PMID: 19661067; PMCID: PMC2781406.
11. Breitinger, U.; Bahnassawy, L. M.; Janzen, D.; Roemer, V.; Becker, C.-M.; Villmann, C.; Breitinger, H. G., PKA and PKC Modulators Affect Ion Channel Function and Internalization of Recombinant Alpha1 and Alpha1-Beta Glycine Receptors. *Front Mol Neurosci*. 2018, 11, 154.
12. Breitinger U, Breitinger HG. Modulators of the Inhibitory Glycine Receptor. *ACS Chem Neurosci*. 2020 Jun 17;11(12):1706-1725. doi: 10.1021/acchemneuro.0c00054. Epub 2020 Jun 3. PMID: 32391682.
13. Burgos CF, Muñoz B, Guzman L, Aguayo LG. Ethanol effects on glycinergic transmission: From molecular pharmacology to behavior responses. *Pharmacol Res*. 2015 Nov;101:18-29. doi: 10.1016/j.phrs.2015.07.002. Epub 2015 Jul 6. PMID: 26158502; PMCID: PMC4623937.
14. Changeux JP, Edelstein SJ. Allosteric receptors after 30 years. *Neuron*. 1998 Nov;21(5):959-80. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80616-9. PMID:

9856454.

15. Du J, Lü W, Wu S, Cheng Y, Gouaux E. Glycine receptor mechanism elucidated by electron cryo-microscopy. *Nature*. 2015 Oct 8;526(7572):224-9. doi: 10.1038/nature14853. Epub 2015 Sep 7. PMID: 26344198; PMCID: PMC4659708.
16. Durisic N, Godin AG, Wever CM, Heyes CD, Lakadamyali M, Dent JA. Stoichiometry of the human glycine receptor revealed by direct subunit counting. *J Neurosci*. 2012 Sep 12;32(37):12915-20. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2050-12.2012. PMID: 22973015; PMCID: PMC3475605.
17. Dutertre S, Becker CM, Betz H. Inhibitory glycine receptors: an update. *J Biol Chem*. 2012 Nov 23;287(48):40216-23. doi: 10.1074/jbc.R112.408229. Epub 2012 Oct 4. PMID: 23038260; PMCID: PMC3504737.
18. Dlugaiczyk J, Hecker D, Neubert C, Buerbank S, Campanelli D, Becker CM, Betz H, Knipper M, Rüttiger L, Schick B. Loss of glycine receptors containing the $\alpha 3$ subunit compromises auditory nerve activity, but not outer hair cell function. *Hear Res*. 2016 Jul;337:25-34. doi: 10.1016/j.heares.2016.05.004. Epub 2016 May 18. PMID: 27208792.
19. Eichler SA, Förster B, Smolinsky B, Jüttner R, Lehmann TN, Föhling M, Schwarz G, Legendre P, Meier JC. Splice-specific roles of glycine receptor $\alpha 3$ in the hippocampus. *Eur J Neurosci*. 2009 Sep;30(6):1077-91. doi: 10.1111/j.1460-9568.2009.06903.x. Epub 2009 Sep 1. PMID: 19723286.
20. Eichler SA, Kirischuk S, Jüttner R, Schaefermeier PK, Legendre P, Lehmann TN, Gloveli T, Grantyn R, Meier JC. Glycinergic tonic inhibition of hippocampal neurons with depolarizing GABAergic transmission elicits histopathological signs of temporal lobe epilepsy. *J Cell Mol Med*. 2008 Dec;12(6B):2848-66. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00357.x. Erratum in: *J Cell Mol Med*. 2012 Apr;16(4):959. Schaefermeier, Philipp K [corrected to Schaefermeier, Philipp K]. PMID: 19210758; PMCID: PMC3828897.

21. Fritschy JM, Harvey RJ, Schwarz G. Gephyrin: where do we stand, where do we go? *Trends Neurosci.* 2008 May;31(5):257-64. doi: 10.1016/j.tins.2008.02.006. Epub 2008 Apr 9. PMID: 18403029.
22. Gallegos S, Muñoz B, Araya A, Aguayo LG. High ethanol sensitive glycine receptors regulate firing in D1 medium spiny neurons in the nucleus accumbens. *Neuropharmacology.* 2019 Dec 1;160:107773. doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.107773. Epub 2019 Sep 12. PMID: 31521620; PMCID: PMC6879106.
23. Groeneweg FL, Trattnig C, Kuhse J, Nawrotzki RA, Kirsch J. Gephyrin: a key regulatory protein of inhibitory synapses and beyond. *Histochem Cell Biol.* 2018 Nov;150(5):489-508. doi: 10.1007/s00418-018-1725-2. Epub 2018 Sep 27. PMID: 30264265.
24. Han, L.; Talwar, S.; Wang, Q.; Shan, Q.; Lynch, J. W., Phosphorylation of alpha3 glycine receptors induces a conformational change in the glycine-binding site. *ACS Chem Neurosci* 2013, 4 (10), 1361-70.
25. Harvey RJ, Depner UB, Wässle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, Smart TG, Harvey K, Schütz B, Abo-Salem OM, Zimmer A, Poisbeau P, Welzl H, Wolfer DP, Betz H, Zeilhofer HU, Müller U. GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science.* 2004 May 7;304(5672):884-7. doi: 10.1126/science.1094925. PMID: 15131310.
26. Huang X, Chen H, Shaffer PL. Crystal Structures of Human GlyR α 3 Bound to Ivermectin. *Structure.* 2017 Jun 6;25(6):945-950.e2. doi: 10.1016/j.str.2017.04.007. Epub 2017 May 4. PMID: 28479061.
27. Ivica J, Lape R, Jazbec V, Yu J, Zhu H, Gouaux E, Gold MG, Sivilotti LG. The intracellular domain of homomeric glycine receptors modulates agonist efficacy. *J Biol Chem.* 2021 Jan-Jun;296:100387. doi: 10.1074/jbc.RA119.012358. Epub 2021 Feb 20. PMID: 33617876; PMCID: PMC7995613.
28. Jansen V, Jikeli JF, Wachten D. How to control cyclic nucleotide signaling by light. *Curr Opin Biotechnol.* 2017 Dec;48:15-20. doi: 10.1016/j.copbio.2017.02.014. Epub 2017 Mar 10. PMID: 28288335.

29. Kinjo T, Watabe T, Kobachi K, Terai K, Matsuda M. Single-Cell Activation of the cAMP-Signaling Pathway in 3D Tissues with FRET-Assisted Two-Photon Activation of bPAC. *ACS Chem Biol*. 2020 Nov 20;15(11):2848-2853. doi: 10.1021/acscchembio.0c00333. Epub 2020 Oct 19. PMID: 33074647.
30. Kuhse J, Kuryatov A, Maulet Y, Malosio ML, Schmieden V, Betz H. Alternative splicing generates two isoforms of the alpha 2 subunit of the inhibitory glycine receptor. *FEBS Lett*. 1991 May 20;283(1):73-7. doi: 10.1016/0014-5793(91)80557-j. PMID: 1645300.
31. Kumar A, Basak S, Rao S, Gicheru Y, Mayer ML, Sansom MSP, Chakrapani S. Mechanisms of activation and desensitization of full-length glycine receptor in lipid nanodiscs. *Nat Commun*. 2020 Jul 27;11(1):3752. doi: 10.1038/s41467-020-17364-5. PMID: 32719334; PMCID: PMC7385131.
32. Langlhofer G, Villmann C. The Intracellular Loop of the Glycine Receptor: It's not all about the Size. *Front Mol Neurosci*. 2016 Jun 3;9:41. doi: 10.3389/fnmol.2016.00041. PMID: 27330534; PMCID: PMC4891346.
33. Lara CO, Burgos CF, Moraga-Cid G, Carrasco MA, Yévenes GE. Pentameric Ligand-Gated Ion Channels as Pharmacological Targets Against Chronic Pain. *Front Pharmacol*. 2020 Mar 3;11:167. doi: 10.3389/fphar.2020.00167. PMID: 32218730; PMCID: PMC7079299.
34. Lemmens V, Thevelein B, Vella Y, Kankowski S, Leonhard J, Mizuno H, Rocha S, Brône B, Meier JC, Hendrix J. Hetero-pentamerization determines mobility and conductance of Glycine receptor $\alpha 3$ splice variants. *Cell Mol Life Sci*. 2022 Oct 5;79(11):540. doi: 10.1007/s00018-022-04506-9. PMID: 36197517; PMCID: PMC9534812.
35. Lewis TM, Schofield PR, McClellan AM. Kinetic determinants of agonist action at the recombinant human glycine receptor. *J Physiol*. 2003 Jun 1;549(Pt 2):361-74. doi: 10.1113/jphysiol.2002.037796. Epub 2003 Apr 4. PMID: 12679369; PMCID: PMC2342959.
36. Lionel AC, Vaags AK, Sato D, Gazzellone MJ, Mitchell EB, Chen HY,

- Costain G, Walker S, Egger G, Thiruvahindrapuram B, Merico D, Prasad A, Anagnostou E, Fombonne E, Zwaigenbaum L, Roberts W, Szatmari P, Fernandez BA, Georgieva L, Brzustowicz LM, Roetzer K, Kaschnitz W, Vincent JB, Windpassinger C, Marshall CR, Trifiletti RR, Kirmani S, Kirov G, Petek E, Hodge JC, Bassett AS, Scherer SW. Rare exonic deletions implicate the synaptic organizer Gephyrin (GPHN) in risk for autism, schizophrenia and seizures. *Hum Mol Genet.* 2013 May 15;22(10):2055-66. doi: 10.1093/hmg/ddt056. Epub 2013 Feb 7. PMID: 23393157.
37. Lin MS, Xiong WC, Li SJ, Gong Z, Cao X, Kuang XJ, Zhang Y, Gao TM, Mechawar N, Liu C, Zhu XH. α 2-glycine receptors modulate adult hippocampal neurogenesis and spatial memory. *Dev Neurobiol.* 2017 Dec;77(12):1430-1441. doi: 10.1002/dneu.22549. Epub 2017 Oct 26. PMID: 29057625.
38. Lynch JW. Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev.* 2004 Oct;84(4):1051-95. doi: 10.1152/physrev.00042.2003. PMID: 15383648.
39. Lynch JW. Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology.* 2009 Jan;56(1):303-9. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.07.034. Epub 2008 Aug 3. PMID: 18721822.
40. Lynch JW, Zhang Y, Talwar S, Estrada-Mondragon A. Glycine Receptor Drug Discovery. *Adv Pharmacol.* 2017;79:225-253. doi: 10.1016/bs.apha.2017.01.003. Epub 2017 Mar 21. PMID: 28528670.
41. Malosio ML, Grenningloh G, Kuhse J, Schmieden V, Schmitt B, Prior P, Betz H. Alternative splicing generates two variants of the alpha 1 subunit of the inhibitory glycine receptor. *J Biol Chem.* 1991 Feb 5;266(4):2048-53. PMID: 1703526.
42. Manzke T, Niebert M, Koch UR, Caley A, Vogelgesang S, Hülsmann S, Ponimaskin E, Müller U, Smart TG, Harvey RJ, Richter DW. Serotonin receptor 1A-modulated phosphorylation of glycine receptor α 3 controls breathing in mice. *J Clin Invest.* 2010 Nov;120(11):4118-28. doi: 10.1172/JCI43029. Epub 2010 Oct 11. PMID: 20978350; PMCID:

PMC2964980.

43. McCracken LM, Lowes DC, Salling MC, Carreau-Vollmer C, Odean NN, Blednov YA, Betz H, Harris RA, Harrison NL. Glycine receptor $\alpha 3$ and $\alpha 2$ subunits mediate tonic and exogenous agonist-induced currents in forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Aug 22;114(34):E7179-E7186. doi: 10.1073/pnas.1703839114. Epub 2017 Aug 7. PMID: 28784756; PMCID: PMC5576794.
44. Meier JC, Henneberger C, Melnick I, Racca C, Harvey RJ, Heinemann U, Schmieden V, Grantyn R. RNA editing produces glycine receptor $\alpha 3$ (P185L), resulting in high agonist potency. *Nat Neurosci*. 2005 Jun;8(6):736-44. doi: 10.1038/nn1467. Epub 2005 May 15. PMID: 15895087.
45. Melzer N, Villmann C, Becker K, Harvey K, Harvey RJ, Vogel N, Kluck CJ, Kneussel M, Becker CM. Multifunctional basic motif in the glycine receptor intracellular domain induces subunit-specific sorting. *J Biol Chem*. 2010 Feb 5;285(6):3730-3739. doi: 10.1074/jbc.M109.030460. Epub 2009 Dec 3. PMID: 19959465; PMCID: PMC2823514.
46. Mihic, S. J.; Ye, Q.; Wick, M. J.; Koltchine, V. V.; Krasowski, M. D.; Finn, S. E.; Mascia, M. P.; Valenzuela, C. F.; Hanson, K. K.; Greenblatt, E. P.; Harris, R. A.; Harrison, N. L., Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors. *Nature* 1997, 389 (6649), 385- 9.
47. Miller PS, Smart TG. Binding, activation and modulation of Cys-loop receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2010 Apr;31(4):161-74. doi: 10.1016/j.tips.2009.12.005. Epub 2010 Jan 25. PMID: 20096941.
48. Moraga-Cid G, San Martín VP, Lara CO, Muñoz B, Marileo AM, Sazo A, Muñoz-Montesino C, Fuentealba J, Castro PA, Guzmán L, Burgos CF, Zeilhofer HU, Aguayo LG, Corringer PJ, Yévenes GE. Modulation of glycine receptor single-channel conductance by intracellular phosphorylation. *Sci Rep*. 2020 Mar 16;10(1):4804. doi: 10.1038/s41598-020-61677-w. PMID: 32179786; PMCID: PMC7076024.
49. Muñoz B, Gallegos S, Peters C, Murath P, Lovinger DM, Homanics GE,

- Aguayo LG. Influence of nonsynaptic $\alpha 1$ glycine receptors on ethanol consumption and place preference. *Addict Biol.* 2020 Mar;25(2):e12726. doi: 10.1111/adb.12726. Epub 2019 Mar 18. PMID: 30884072; PMCID: PMC6751026.
50. Muñoz B, Yevenes GE, Förster B, Lovinger DM, Aguayo LG. Presence of Inhibitory Glycinergic Transmission in Medium Spiny Neurons in the Nucleus Accumbens. *Front Mol Neurosci.* 2018 Jul 11;11:228. doi: 10.3389/fnmol.2018.00228. PMID: 30050406; PMCID: PMC6050475.
51. Naito A, Muchhala KH, Trang J, Asatryan L, Trudell JR, Homanics GE, Alkana RL, Davies DL. Manipulations of extracellular Loop 2 in $\alpha 1$ GlyR ultra-sensitive ethanol receptors (USERS) enhance receptor sensitivity to isoflurane, ethanol, and lidocaine, but not propofol. *Neuroscience.* 2015 Jun 25;297:68-77. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.03.034. Epub 2015 Mar 28. PMID: 25827497; PMCID: PMC4428915.
52. Nikolic Z, Laube B, Weber RG, Lichter P, Kioschis P, Poustka A, Mülhardt C, Becker CM. The human glycine receptor subunit alpha3. Glra3 gene structure, chromosomal localization, and functional characterization of alternative transcripts. *J Biol Chem.* 1998 Jul 31;273(31):19708-14. doi: 10.1074/jbc.273.31.19708. PMID: 9677400.
53. Pilorge M, Fassier C, Le Corrionc H, Potey A, Bai J, De Gois S, Delaby E, Assouline B, Guinchat V, Devillard F, Delorme R, Nygren G, Råstam M, Meier JC, Otani S, Cheval H, James VM, Topf M, Dear TN, Gillberg C, Leboyer M, Giros B, Gautron S, Hazan J, Harvey RJ, Legendre P, Betancur C. Genetic and functional analyses demonstrate a role for abnormal glycinergic signaling in autism. *Mol Psychiatry.* 2016 Jul;21(7):936-45. doi: 10.1038/mp.2015.139. Epub 2015 Sep 15. PMID: 26370147; PMCID: PMC5382231.
54. Pribilla I, Takagi T, Langosch D, Bormann J, Betz H. The atypical M2 segment of the beta subunit confers picrotoxinin resistance to inhibitory glycine receptor channels. *EMBO J.* 1992 Dec;11(12):4305-11. doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05529.x. Erratum in: *EMBO J.* 1994 Mar 15;13(6):1493. PMID: 1385113; PMCID: PMC557003.

55. Probst A, Cortés R, Palacios JM. The distribution of glycine receptors in the human brain. A light microscopic autoradiographic study using [3H]strychnine. *Neuroscience*. 1986;17(1):11-35. doi: 10.1016/0306-4522(86)90222-8. PMID: 3008022.
56. Sadtler S, Laube B, Lashub A, Nicke A, Betz H, Schmalzing G. A basic cluster determines topology of the cytoplasmic M3-M4 loop of the glycine receptor alpha1 subunit. *J Biol Chem*. 2003 May 9;278(19):16782-90. doi: 10.1074/jbc.M213077200. Epub 2003 Feb 28. PMID: 12611885.
57. San Martín VP, Sazo A, Utreras E, Moraga-Cid G, Yévenes GE. Glycine Receptor Subtypes and Their Roles in Nociception and Chronic Pain. *Front Mol Neurosci*. 2022 Mar 23;15:848642. doi: 10.3389/fnmol.2022.848642. PMID: 35401105; PMCID: PMC8984470.
58. Sato K, Kiyama H, Tohyama M. Regional distribution of cells expressing glycine receptor alpha 2 subunit mRNA in the rat brain. *Brain Res*. 1992 Sep 11;590(1-2):95-108. doi: 10.1016/0006-8993(92)91085-s. PMID: 1330217.
59. Schaefer N, Langlhofer G, Kluck CJ, Villmann C. Glycine receptor mouse mutants: model systems for human hyperekplexia. *Br J Pharmacol*. 2013 Nov;170(5):933-52. doi: 10.1111/bph.12335. PMID: 23941355; PMCID: PMC3949644.
60. Sola M, Bavro VN, Timmins J, Franz T, Ricard-Blum S, Schoehn G, Ruigrok RW, Paarmann I, Saiyed T, O'Sullivan GA, Schmitt B, Betz H, Weissenhorn W. Structural basis of dynamic glycine receptor clustering by gephyrin. *EMBO J*. 2004 Jul 7;23(13):2510-9. doi: 10.1038/sj.emboj.7600256. Epub 2004 Jun 17. PMID: 15201864; PMCID: PMC449768.
61. Stierl M, Stumpf P, Udvari D, Gueta R, Hagedorn R, Losi A, Gärtner W, Petereit L, Efetova M, Schwarzel M, Oertner TG, Nagel G, Hegemann P. Light modulation of cellular cAMP by a small bacterial photoactivated adenylyl cyclase, bPAC, of the soil bacterium *Beggiatoa*. *J Biol Chem*. 2011 Jan 14;286(2):1181-8. doi: 10.1074/jbc.M110.185496. Epub 2010 Oct 28.

PMID: 21030594; PMCID: PMC3020725.

62. Thompson JRE, Beaudoin CA, Lummis SCR. Modelling and Molecular Dynamics Predict the Structure and Interactions of the Glycine Receptor Intracellular Domain. *Biomolecules*. 2023 Dec 7;13(12):1757. doi: 10.3390/biom13121757. PMID: 38136628; PMCID: PMC10741472.
63. Tyagarajan SK, Fritschy JM. Gephyrin: a master regulator of neuronal function? *Nat Rev Neurosci*. 2014 Mar;15(3):141-56. doi: 10.1038/nrn3670. PMID: 24552784.
64. Tziridis K, Buerbank S, Eulenburg V, Dlugaiczyk J, Schulze H. Deficit in acoustic signal-in-noise detection in glycine receptor $\alpha 3$ subunit knockout mice. *Eur J Neurosci*. 2017 Feb;45(4):581-586. doi: 10.1111/ejn.13489. Epub 2017 Jan 18. PMID: 27891689.
65. Vaello, M. L.; Ruiz-Gomez, A.; Lerma, J.; Mayor, F., Jr., Modulation of inhibitory glycine receptors by phosphorylation by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1994, 269 (3), 2002-8.
66. Velazquez-Flores MA, Salceda R. Modulación de los receptores ionotrópicos de tipo cys-loop por proteincinasas A y C [Cys-loop ligand-gated ion channels modulation by protein kinases A and C]. *Rev Neurol*. 2011 Feb 1;52(3):173-81. Spanish. PMID: 21287494.
67. Velázquez-Flores MÁ, Salceda R. Glycine receptor internalization by protein kinases activation. *Synapse*. 2011 Nov;65(11):1231-8. doi: 10.1002/syn.20963. Epub 2011 Jun 27. PMID: 21656573.
68. Villmann, C.; Oertel, J.; Melzer, N.; Becker, C. M., Recessive hyperekplexia mutations of the glycine receptor alpha1 subunit affect cell surface integration and stability. *J Neurochem* 2009, 111 (3), 837-47.
69. Winkelmann A, Maggio N, Eller J, Caliskan G, Semtner M, Häussler U, Jüttner R, Dugladze T, Smolinsky B, Kowalczyk S, Chronowska E, Schwarz G, Rathjen FG, Rechavi G, Haas CA, Kulik A, Gloveli T, Heinemann U, Meier JC. Changes in neural network homeostasis trigger neuropsychiatric symptoms. *J Clin Invest*. 2014 Feb;124(2):696-711. doi: 10.1172/JCI71472. Epub 2014 Jan 16. PMID: 24430185; PMCID:

PMC3904623.

70. Yang Z, Taran E, Webb TI, Lynch JW. Stoichiometry and subunit arrangement of $\alpha 1\beta$ glycine receptors as determined by atomic force microscopy. *Biochemistry*. 2012 Jul 3;51(26):5229-31. doi: 10.1021/bi300063m. Epub 2012 Jun 21. PMID: 22715885.
71. Yang S, Constantin OM, Sachidanandan D, Hofmann H, Kunz TC, Kozjak-Pavlovic V, Oertner TG, Nagel G, Kittel RJ, Gee CE, Gao S. PACmn for improved optogenetic control of intracellular cAMP. *BMC Biol*. 2021 Oct 18;19(1):227. doi: 10.1186/s12915-021-01151-9. PMID: 34663304; PMCID: PMC8522238.
72. Yevenes GE, Moraga-Cid G, Avila A, Guzmán L, Figueroa M, Peoples RW, Aguayo LG. Molecular requirements for ethanol differential allosteric modulation of glycine receptors based on selective Gbetagamma modulation. *J Biol Chem*. 2010 Sep 24;285(39):30203-13. doi:10.1074/jbc.M110.134676. Epub 2010 Jul 20. PMID: 20647311; PMCID: PMC2943258.
73. Yevenes GE, Zeilhofer HU. Allosteric modulation of glycine receptors. *Br J Pharmacol*. 2011 Sep;164(2):224-36. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01471.x. PMID: 21557733; PMCID: PMC3174402.
74. Yévenes, G. E.; Zeilhofer, H. U., Molecular sites for the positive allosteric modulation of glycine receptors by endocannabinoids. *PLoS One*. 2011, 6 (8), e23886. doi: 10.1371.
75. Yu J, Zhu H, Lape R, Greiner T, Du J, Lü W, Sivilotti L, Gouaux E. Mechanism of gating and partial agonist action in the glycine receptor. *Cell*. 2021 Feb 18;184(4):957-968.e21. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.026. Epub 2021 Feb 9. PMID: 33567265; PMCID: PMC8115384.
76. Zeilhofer HU. The glycinergic control of spinal pain processing. *Cell Mol Life Sci*. 2005 Sep;62(18):2027-35. doi: 10.1007/s00018-005-5107-2. PMID: 15968463.
77. Zeilhofer HU, Wildner H, Yévenes GE. Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiol Rev*. 2012 Jan;92(1):193-

235. doi: 10.1152/physrev.00043.2010. PMID: 22298656; PMCID: PMC3590010.
78. Zeilhofer HU, Acuña MA, Gingras J, Yévenes GE. Glycine receptors and glycine transporters: targets for novel analgesics? *Cell Mol Life Sci.* 2018 Feb;75(3):447-465. doi: 10.1007/s00018-017-2622-x. Epub 2017 Aug 8. PMID: 28791431.
79. Zeilhofer HU, Acuña MA, Gingras J, Yévenes GE. Glycine receptors and glycine transporters: targets for novel analgesics? *Cell Mol Life Sci.* 2018 Feb;75(3):447-465. doi: 10.1007/s00018-017-2622-x. Epub 2017 Aug 8. PMID: 28791431.
80. Zeilhofer HU, Werynska K, Gingras J, Yévenes GE. Glycine Receptors in Spinal Nociceptive Control-An Update. *Biomolecules.* 2021 Jun 6;11(6):846. doi: 10.3390/biom11060846. PMID: 34204137; PMCID: PMC8228028.
81. Zhang Y, Ho TNT, Harvey RJ, Lynch JW, Keramidas A. Structure- Function Analysis of the GlyR α 2 Subunit Autism Mutation p.R323L Reveals a Gain-of-Function. *Front Mol Neurosci.* 2017 May 23;10:158. doi: 10.3389/fnmol.2017.00158. PMID: 28588452; PMCID: PMC5440463.
82. Zhu H, Gouaux E. Architecture and assembly mechanism of native glycine receptors. *Nature.* 2021 Nov;599(7885):513-517. doi: 10.1038/s41586-021-04022-z. Epub 2021 Sep 23. PMID: 34555840; PMCID: PMC8647860.