

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***TRANSMISIÓN GLICINÉRGICA Y ALCOHOLISMO:
DESARROLLO DE UN VECTOR ADENOASOCIADO
CODIFICANTE DE UNA VERSIÓN MUTADA (KK385/386AA)
DE LA SUBUNIDAD ALFA 1 DEL RECEPTOR DE GLICINA***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Magíster en Bioquímica área de Especialización en Toxicología y
Diagnóstico Molecular y Memoria para optar al Título de Bioquímico
por:**

ADOLFO JAVIER MALDONADO LAZO

Director de Tesis: Dr. Mario Francis Rivera Meza

Co-director de Tesis: Dr. Luis Gerardo Aguayo Hernández

Santiago de Chile

Agosto 2020

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

ADOLFO JAVIER MALDONADO LAZO

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Toxicología y Diagnóstico Molecular y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día


Director de Tesis:

Dr. Mario Rivera Meza



Co-director de Tesis:

Dr. Luis Aguayo Hernández



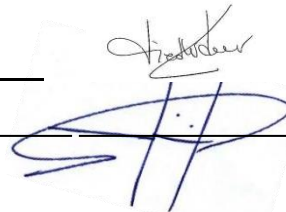
Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Alfonso Paredes



Dra. Jenny Fiedler

Dr. Óscar Cerda



FINANCIAMIENTO

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Farmacoterapia Experimental del Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Fue financiada por los siguientes proyectos: DQFT 2018-1 (M. Rivera), PII 2018 (M. Rivera), NIH 1R01AA025718-01 (Dr. Luis Aguayo H.) y CONICYT (CONICYT-PFCHA/MagísterNacional/2018 – 22181214).

PRESENTACIÓN EN CONGRESO

Los resultados de los experimentos desarrollados en esta tesis fueron presentados en:

Maldonado A., Araya A., Rivera-Meza M., Aguayo, L. G.

“Glycinergic transmission and alcoholism: development of an adeno associated vector encoding a mutated version (KK385 / 386AA) of glycine receptor alpha 1 subunit” XL Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. Santa Cruz, Chile, 13-16 de noviembre de 2018.

AGRADECIMIENTOS

“Nuestro entusiasmo alentaba a estos días que corren
entre la multitud de la igualdad de los días.

Nuestra debilidad cifraba en ellos
nuestra última esperanza.

Pensábamos y el tiempo que no tendría precio
se nos iba pasando pobremente
y estos son, pues, los años venideros.

Todo lo íbamos a resolver ahora.

Teníamos la vida por delante.

Lo mejor era no precipitarse.” *(Enrique Lihn, Destiempo, 1963)*

Por fin llegó el momento en que finaliza esta importante etapa de mi vida: costó, tardó, pero se logró. Quiero agradecer a todos quienes colaboraron durante todos estos años en el desarrollo de mi tesis, tanto de forma directa como indirecta.

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia, sin su ayuda, todo hubiese sido mucho más difícil. A Tania, mi polola, por su permanente compañía y apoyo, tanto en las situaciones favorables como en las más complicadas.

Al Dr. Mario Rivera, por su constante preocupación y consejo en todas las etapas de mi tesis. Al Dr. Luis Aguayo, por confiarme este proyecto y apoyarme cada vez que lo necesité. A la comisión de mi tesis, por sus sugerencias y su paciencia. A Aníbal Araya, por su valiosa colaboración en el desarrollo de ensayos de electrofisiología. A mis compañeros de laboratorio Diego y María Elena por su empatía y por hacer más entretenida mi estadía.

Finalmente, les agradezco de forma muy especial a todos los trabajadores subcontratados que conocí en la universidad, tanto a guardias como personal de aseo, por su efímera, pero valiosa compañía en muchas tarde-noches de semana y en solitarios fines de semana. Su buen humor, sus anécdotas, junto con el ejemplo de perseverancia y resiliencia que dejaron en mi memoria, son experiencias realmente conmovedoras. Y de seguro influirán en mi futuro.

“Y tú quieres oír, tú quieres entender. Y yo te digo: olvida lo que oyes, lees o escribes. Lo que escribo no es para ti, ni para mí, ni para los iniciados. Es para la niña que nadie saca a bailar, es para los hermanos que afrontan la borrachera y a quienes desdeñan los que se creen santos, profetas o poderosos.” *(Jorge Teillier, Botella al mar, 1985)*

ÍNDICE GENERAL

FINANCIAMIENTO	I
PRESENTACIÓN EN CONGRESO	II
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE GENERAL	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ABREVIATURAS	IX
RESUMEN	X
SUMMARY	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Alcohol y salud pública.	1
1.2. Farmacoterapia.....	1
1.3. Efectos del alcohol en el cerebro.	2
1.4. Efectos del etanol en el Sistema Mesolímbico Dopaminérgico.	2
1.5. El receptor de glicina	5
1.6. Farmacología y toxicología del receptor de glicina.	7
1.7. Efectos del etanol en el GlyR.	9
1.8. Receptor de glicina y alcoholismo.	10
1.9. Sistema Cre- <i>loxP</i>	12
2. HIPÓTESIS	14
3. OBJETIVO GENERAL	14
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4.1. Introducir mediante mutación sitio dirigida, los cambios aminoacídicos KK385/386AA en el cDNA del gen de la subunidad $\alpha 1$ de GlyR.....	14
4.2. Incorporar los cDNA de los genes silvestre y mutado de GlyR en plásmidos adenoasociados Cre-dependientes.....	14
4.3. Determinar mediante RT-PCR, inmunocitoquímica y electrofisiología si estos plásmidos precursores de vectores AAV, expresan una proteína funcional en células en cultivo bajo un contexto Cre.	14
5. MATERIALES	15
5.1. Material biológico.....	15
5.1.1. Líneas celulares.....	15
5.1.2. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	15

5.2.	Reactivos.....	15
5.2.1.	Enzimas.....	15
5.2.2.	Anticuerpos.....	15
5.2.3.	Reactivos de cultivo celular.....	16
5.2.4.	Reactivos generales.....	16
5.3.	Plásmidos.....	16
5.4.	Oligonucleótidos.....	18
6.	MÉTODOS	20
6.1.	Secuenciación de DNA del plásmido pAAV-DIO-GlyR α 1wt-mCitrine.....	20
6.2.	Transformación de bacterias.....	20
6.3.	Purificación de plásmidos.....	20
6.3.1.	Mediante kit comercial.....	20
6.3.2.	Amplificación de plásmidos mediante método de Begbie modificado.....	21
6.3.3.	Amplificación de plásmidos mediante método de Maniatis modificado.....	21
6.3.4.	Purificación de plásmidos mediante lisis alcalina de mini preparación.....	21
6.3.5.	Purificación de plásmidos mediante lisis alcalina de midi preparación.....	22
6.4.	Determinación de la concentración de las soluciones de plásmido.....	22
6.5.	Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	22
6.6.	Cultivo de células eucariontes.....	23
6.6.1.	Cultivo de células HEK-293.....	23
6.6.2.	Cultivo de células PC-12.....	24
6.7.	Generación de plásmidos.....	24
6.7.1.	Generación de pAAV-Cre.....	24
6.7.2.	Generación de pAAV-DIO-mCitrine.....	25
6.8.	Introducción de cambios aminoacídicos KK385/386AA en el gen de la subunidad α 1 de GlyR mediante mutación sitio dirigida.....	26
6.9.	Co-transfección de líneas celulares.....	26
6.9.1.	Co-transfección mediante polietilenimina (PEI).....	26
6.9.2.	Co-transfección mediante Lipofectamina-2000 [®]	27
6.9.3.	Co-transfección mediante electroporación.....	27
6.10.	Detección de la fluorescencia de mCitrina en cultivos celulares.....	28
6.11.	Detección de la expresión de GlyR α 1wt y GlyR α 1mut mediante RT-PCR.....	28
6.12.	Detección de las mutaciones AA1524/1525GC y AA1527/1528GC en el amplicón generado a partir del cDNA de GlyR α 1mut.....	30

6.13.	<i>Cell sorting</i> .	30
6.14.	Estudio de la expresión GlyR α 1 $_{wt}$ y GlyR α 1 $_{mut}$ mediante inmunocitoquímica.	31
6.15.	Estudios de funcionalidad GlyR α 1 mediante electrofisiología.	32
7.	RESULTADOS	33
7.1.	Detección de la expresión del reportero mCitrine en experimentos de transfección de células Cre positivas con el plásmido de transferencia pAAV-DIO-GlyR-mCitrine...	33
7.1.1.	Validación del plásmido pAAV-DIO-GlyR-mCitrine.	33
7.1.2.	Caracterización del plásmido pLV-Cre.	34
7.1.3.	Purificación plásmido pLV-Cre en calidad para transfección.	35
7.1.4.	Co-transfección de células HEK-293.	36
7.1.5.	Transfección de células PC-12.	37
7.1.6.	Generación plásmido pAAV-Cre.	38
7.1.7.	Co-transfección de células PC-12 con pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine y pAAV-Cre.	40
7.1.8.	Co-transfección de células PC-12 con pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine y pAAV-Cre mediante electroporación.	41
7.2.	Introducción de cambios aminoacídicos KK385/386AA en el gen de la subunidad α 1 de GlyR mediante mutación sitio dirigida.	42
7.3.	Generación del plásmido control pAAV-DIO-mCitrine.	44
7.4.	Determinar mediante RT-PCR, inmunocitoquímica y electrofisiología de la expresión de GlyR α 1 $_{wt}$ y GlyR α 1 $_{mut}$ en células Cre.	45
7.4.1.	Estudio de la expresión GlyR α 1 $_{wt}$ y GlyR α 1 $_{mut}$ mediante RT-PCR.	45
7.4.2.	Estudio de la expresión GlyR α 1 $_{wt}$ y GlyR α 1 $_{mut}$ mediante inmunocitoquímica.	47
7.4.3.	Estudios de funcionalidad GlyR α 1 $_{wt}$ y GlyR α 1 $_{mut}$.	48
8.	DISCUSIÓN	50
8.1.	Validación del plásmido pAAV-DIO-GlyR-mCitrine.	51
8.2.	Expresión Cre-dependiente de GlyR α 1 en las líneas celulares.	51
8.3.	Vectores virales adenoasociados como agentes de entrega génica.	55
8.4.	Respuesta Inmune del vector AAV.	56
8.5.	Estudio de la expresión de GlyR α 1 $_{wt}$ y GlyR α 1 $_{mut}$ mediante RT-PCR.	57
8.6.	<i>Cell sorting</i> e inmunocitoquímica.	57
8.7.	Estudios electrofisiológicos.	58
9.	CONCLUSIONES	60
10.	REFERENCIAS	62
11.	ANEXOS	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema mesolímbico dopaminérgico.	3
Figura 2. Principales participantes en la activación del sistema mesolímbico mediado por el alcohol.	5
Figura 3. Estructura del receptor de glicina.	6
Figura 4. Biosíntesis y metabolismo de la glicina.	7
Figura 5. Esquema de la sinapsis glicinérgica.	8
Figura 6. Duración de la pérdida del reflejo de enderezamiento (LORR) producida por 3,5 g/kg de etanol.	11
Figura 7. Esquema que indica la inversión mediada por el sistema <i>Cre/loxP</i>	12
Figura 8. Caracterización del plásmido pAAV-DIO-GlyR α 1 wt -mCitrine.	34
Figura 9. Caracterización del plásmido pLV-Cre.	35
Figura 10. Fotomicrografías de fluorescencia de células HEK-293 transfectadas.	36
Figura 11. Fotomicrografías de fluorescencia de células PC-12 transfectadas con distintas proporciones de pAAV-DIO-GlyR α 1 wt -mCitrine y pLV-Cre.	37
Figura 12. Esquema de generación de plásmido pAAV-Cre.	39
Figura 13. Caracterización del plásmido pAAV-Cre.	39
Figura 14. Fotomicrografías de fluorescencia de células PC-12 transfectadas con distintas proporciones de pAAV-DIO-GlyR α 1 wt -mCitrine y pAAV-Cre.	40
Figura 15. Fotomicrografías de fluorescencia de células PC-12 transfectadas usando lipofectamina 2000.	41
Figura 16. Fotomicrografías de fluorescencia de células PC-12 electroporadas con distintas proporciones de pAAV-DIO-GlyR α 1 wt -mCitrine y pAAV-Cre.	42
Figura 17. Esquema de cambios nucleotídicos en cDNA de GlyR α 1 wt para generar GlyR α 1 mut	43
Figura 18. Imagen de la secuenciación del cDNA de GlyR α 1 mut del plásmido pAAV-DIO-GlyR α 1 mut -mCitrine.	43
Figura 19. Esquema de generación de plásmido pAAV-DIO-mCitrine.	44

Figura 20. Caracterización del plásmido pAAV-DIO-mCitrine.	45
Figura 21. Fotografías de los productos de RT-PCR de células PC12 co-transfectadas con pAAV-DIO-GlyR α 1 wt -mCitrine/pAAV-Cre, pAAV-DIO-GlyR α 1 mut -mCitrine/pAAV-Cre, y pAAV-DIO-mCitrine/pAAV-Cre.	46
Figura 22. Fotomicrografías de los ensayos de inmunocitoquímica de células PC-12 co-transfectadas con plásmidos codificantes de GlyR α 1 wt y GlyR α 1 mut	48
Figura 23. Corriente evocada por glicina de GlyR α 1 wt	49
Figura A1. Esquema gráfico del plásmido pAAV-DIO-GlyR α 1 wt -mCitrine.	70
Figura A2. Esquema gráfico del plásmido pLV-Cre.	71
Figura A3. Esquema gráfico del plásmido pAAV-MCS.	72
Figura A4. Esquema gráfico del plásmido pAAV-Cre.	73
Figura A5. Esquema gráfico del plásmido pAAV-DIO-GlyR α 1 mut -mCitrine.	74
Figura A6. Esquema gráfico del plásmido pAAV-DIO-mCitrine.	75
Figura A7. Esquema gráfico del plásmido pmCitrine-N1.	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR convencional y RT-PCR.	19
Tabla 2. Programa de temperatura de las reacciones de transcripción inversa.	29
Tabla 3. Programa de temperatura de las reacciones de PCR convencional.	30
Tabla 4. Cantidad y porcentaje de células PC-12 positivas para la expresión de mCitrine separadas por <i>cell sorter</i>	47

ABREVIATURAS

AAV: virus adeno-asociado

ADH: Deshidrogenasa alcohólica

ALDH: Deshidrogenasa aldehídica

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

DMEM: medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: Deoxirribonucleótidos

GABA: Ácido gamma-aminobutírico

GlyR: receptor de glicina

GlyR α 1 wt : versión silvestre de la subunidad alfa 1 del receptor de glicina

GlyR α 1 mut : versión mutada de la subunidad alfa 1 del receptor de glicina

HEK-293: Células embrionarias de riñón humano

LB: Medio de cultivo bacteriano Luria-Bertani

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

nAc: núcleo accumbens

NMDA: N-metil-D-aspartato

PC-12: células de feocromocitoma de rata

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RNA: Ácido ribonucleico

RPMI-1640: medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute* -1640

RT: Transcripción inversa

SNC: Sistema nervioso central

VTA: Área Tegmental Ventral

RESUMEN

El abuso de alcohol genera grandes problemas sociales, económicos y de salud en el mundo. Pese a ello, hay pocos tratamientos farmacológicos para tratar el alcoholismo, los cuales además tienen baja eficacia. Para desarrollar mejores fármacos se necesita conocer los mecanismos moleculares asociados a los efectos del alcohol. El alcohol genera efectos adictivos al activar el sistema mesolímbico dopaminérgico cerebral, aumentando la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (nAc). Se cree que la activación del sistema mesolímbico mediada por etanol se debe a la capacidad del etanol de potenciar la función de los receptores de glicina (GlyR) inhibitorios presentes en las neuronas GABAérgicas del nAc. Se ha propuesto que el alcohol potencia la función de GlyR mediante un aumento de la interacción de la subunidad $\beta\gamma$ de proteína G (G- $\beta\gamma$) con los dominios intracelulares 385KK386 de la subunidad $\alpha 1$ de GlyR. Aún no se conoce qué circuitos neuronales están asociados a estos efectos, pero se ha encontrado que en nAc se expresa principalmente la subunidad $\alpha 1$ de GlyR. Se dispone de ratones que expresan de forma exclusiva la recombinasa Cre en neuronas GABAérgicas D1 del nAc, por lo que la administración de un vector que codifique para la subunidad $\alpha 1$ mutada de GlyR de forma Cre-dependiente (sistema Cre-*loxP*) permitiría una expresión específica de la subunidad $\alpha 1$ en este tipo de neuronas. De esta forma, se podría entender de mejor forma el rol de los GlyR presentes en nAc en la toxicidad y efectos adictivos del alcohol.

Por lo tanto, se propone la siguiente **hipótesis**: “**La generación de un vector viral adenoasociado (AAV) codificante de la subunidad $\alpha 1$ mutada (KK385/386AA) del receptor de glicina (GlyR), flanqueada por sitios *loxP* invertidos, permite la expresión específica de un GlyR funcional en células que expresan la recombinasa Cre**”.

Para ello, en esta tesis se plantean los siguientes **objetivos específicos**: **1)** Introducir mediante mutación sitio dirigida, los cambios aminoacídicos KK385/386AA en el cDNA del gen de la subunidad $\alpha 1$ de GlyR, **2)** incorporar los cDNA de los genes silvestre y mutado de GlyR $\alpha 1$ en plásmidos adenoasociados Cre-dependientes y **3)** determinar mediante RT-PCR, inmunocitoquímica y electrofisiología, si estos plásmidos expresan una proteína funcional en células en cultivo bajo un contexto Cre.

SUMMARY

Glycinergic transmission and alcoholism: Development of an adenoviral vector coding for a mutant version (KK385/386AA) of the glycine receptor $\alpha 1$ subunit.

Alcohol abuse generates major social, economic and health problems in the world. Despite this, there are few pharmacological treatments of alcoholism, which also have low efficacy. To develop better drugs, the molecular mechanisms associated to the effects of alcohol must be understood. Alcohol generates its addictive effects by activating the brain dopaminergic mesolimbic system, increasing the release of dopamine in the nucleus accumbens (nAc). It has been suggested that the ethanol-mediated mesolimbic system activation is due to the ability of ethanol to enhance the function of inhibitory glycine (GlyR) receptors present in the GABAergic neurons of nAc.

It has been argued that alcohol enhances the function of GlyR by increasing the interaction of the $\beta\gamma$ subunit of G protein (G- $\beta\gamma$) with the intracellular domain 385KK386 of the $\alpha 1$ subunit. It is not known which neural circuits are associated with these effects, but it has been found that in nAc the $\alpha 1$ subunit of GlyR is highly expressed. There are available mice expressing exclusively the Cre recombinase in D1 GABAergic neurons of the nAc, consequently the administration of a vector encoding a mutated $\alpha 1$ subunit of GlyR in a Cre-dependent manner (Cre-*loxP* system) would allow a tissue-specific expression in this type of neurons. Hence, the role of the nAc GlyRs in the toxicity and addictive effects of alcohol could be better understood.

Therefore, the following **hypothesis** is proposed: **“The generation of an adeno-associated viral vector (AAV) encoding the mutated $\alpha 1$ subunit (KK385/386AA) of the glycine receptor (GlyR), flanked by inverted *loxP* sites, allows direct expression of a functional GlyR in cells expressing Cre recombinase”.**

To this end, the following **specific objectives** are proposed: **1)** To introduce the KK385/386AA amino acid changes by means of a site-directed mutation in the GlyR $\alpha 1$ subunit gene, **2)** To incorporate the GlyR wild and mutated genes into Cre-dependent adeno-associated plasmids, and **3)** To determine by RT-PCR, immunofluorescence and electrophysiology if these plasmids express a functional protein in cells in culture under a Cre context.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Alcohol y salud pública.

El abuso del consumo de alcohol puede llevar a enfermedades, problemas sociales y problemas económicos. En el año 2014, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que el 5,9% de las muertes a nivel mundial se podían atribuir al consumo de alcohol. Además, en este mismo estudio se determinó que el consumo nocivo del alcohol es un factor causal de más de 200 enfermedades, entre las que destacan: dependencia, cirrosis hepática y varios cánceres (OMS, 2014).

1.2. Farmacoterapia.

Actualmente, existen sólo tres tratamientos farmacológicos para el alcoholismo, aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos del gobierno estadounidense (FDA): i) el disulfiram, que corresponde a un inhibidor de la deshidrogenasa aldehídica (ALDH). Los pacientes que usan este fármaco, al consumir alcohol presentan una acumulación del metabolito acetaldehído, el cual, genera efectos desagradables muy intensos que llevan finalmente a una aversión al consumo de alcohol. ii) el acamprosato, fármaco utilizado para prevenir la recaída en el consumo de alcohol. No se conoce su mecanismo de acción exacto, pero se sugiere que inhibe la transmisión glutamatérgica, contrarrestando la hiperexcitación del sistema nervioso central que se presenta en el período de desintoxicación. iii) la naltrexona, un antagonista opioide no selectivo, que reduce el ansia por beber alcohol y los efectos reforzantes de este. Además, un tratamiento aprobado por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA): el nalmefeno, un antagonista de receptores mu y delta-opioide y agonista parcial de receptor kappa-opioide, aprobado para la reducción del consumo de alcohol (Swift y Aston, 2015; Soyka y Müller, 2017). Hay muchos estudios que indican resultados dispares en cuanto a la eficacia de estos fármacos; por otro lado, estos tratamientos han demostrado poseer modestos efectos terapéuticos y numerosos efectos secundarios que limitan la adherencia por parte de los pacientes (Soyka y Müller, 2017).

La falta de tratamientos farmacológicos efectivos contra el abuso del alcohol, se debe en parte a que la neurobiología del alcoholismo es compleja, ya que están implicados varios

sistemas neuroquímicos y mecanismos que no se conocen por completo, por lo que se requiere más investigación para tener una visión detallada de las bases moleculares del alcoholismo para poder desarrollar mejores fármacos.

1.3. Efectos del alcohol en el cerebro.

El alcohol es un agente tóxico con propiedades psicotrópicas, que genera efectos agudos en el sistema nervioso, que van desde la desinhibición, sedación e hipnosis hasta la depresión respiratoria y muerte, dependiendo de la dosis suministrada. Los efectos agudos del alcohol en el cerebro son del tipo depresor, y se ha postulado que posee acción sobre un número importante y diverso de blancos moleculares, lo que resulta en una farmacología del alcohol muy compleja. Se ha reportado una acción directa del etanol sobre blancos moleculares específicos, como los receptores de glicina (Engblom y Akerman, 1991), receptor del ácido γ -aminobutírico tipo A (GABA_A) (Suzdak y cols., 1986), receptor nicotínico de acetilcolina (Bradley y cols., 1980), receptor de serotonina tipo 3 (5-HT₃) (Lovinger y White, 1991), receptor de NMDA (Lovinger y cols., 1989), canales de Ca⁺² tipo L (Walter y Messing, 1999) y canales de K⁺ dependientes de proteína G (GIRKs) (Kobayashi y cols., 1999). Estudios de mutagénesis sitio-dirigida, han permitido identificar en estos receptores de membrana, dominios específicos en los cuales el etanol pareciera actuar directamente. Esta interacción etanol-receptor generaría cambios conformacionales en el receptor que modificarían su función, ya sea potenciándola o inhibiéndola, lo que se asociaría con los efectos farmacológicos y toxicológicos manifestados por los individuos que consumen alcohol. También se han reportados efectos del alcohol no solo a nivel de receptores, sino que también a nivel de varios neurotransmisores como dopamina, acetilcolina y beta-endorfinas. De gran importancia para la génesis del abuso de alcohol son los efectos del etanol en la función dopaminérgica (Spanagel, 2009).

1.4. Efectos del etanol en el Sistema Mesolímbico Dopaminérgico.

El sistema mesolímbico dopaminérgico cumple un rol fundamental en el efecto reforzante de distintas drogas de abuso que generan dependencia como cocaína, anfetamina, cannabis, opioides y también el alcohol. Este circuito cerebral está constituido por neuronas dopaminérgicas cuyos somas se encuentran en el Área Tegmental Ventral (VTA), las que proyectan sus axones hacia el Núcleo Accumbens (nAc) y otras regiones corticales (Di

Chiara e Imperato, 1988). El alcohol al igual que otras drogas de abuso, es capaz de activar estas neuronas dopaminérgicas verificándose un aumento de la liberación de dopamina en el nAc, desencadenando efectos placenteros que en acción repetitiva pueden llevar a la adicción de la droga administrada (Söderpalm y Ericson, 2011). En la **Figura 1** se muestra un esquema de las conexiones neuronales que forman el sistema mesolímbico, en ella se observa que los somas de las neuronas dopaminérgicas del VTA están en parte reguladas por interneuronas GABAérgicas, por proyecciones colinérgicas provenientes del tegmento laterodorsal y del núcleo pedunculopontino, y por proyecciones GABAérgicas provenientes del NAc, que cierran este circuito. El nAc está compuesto principalmente por somas de neuronas GABAérgicas (medium spiny neurons) inervadas por interneuronas GABAérgicas y colinérgicas, y además por proyecciones glutamatérgicas provenientes principalmente de la corteza prefrontal (Russo y Nestler, 2013).

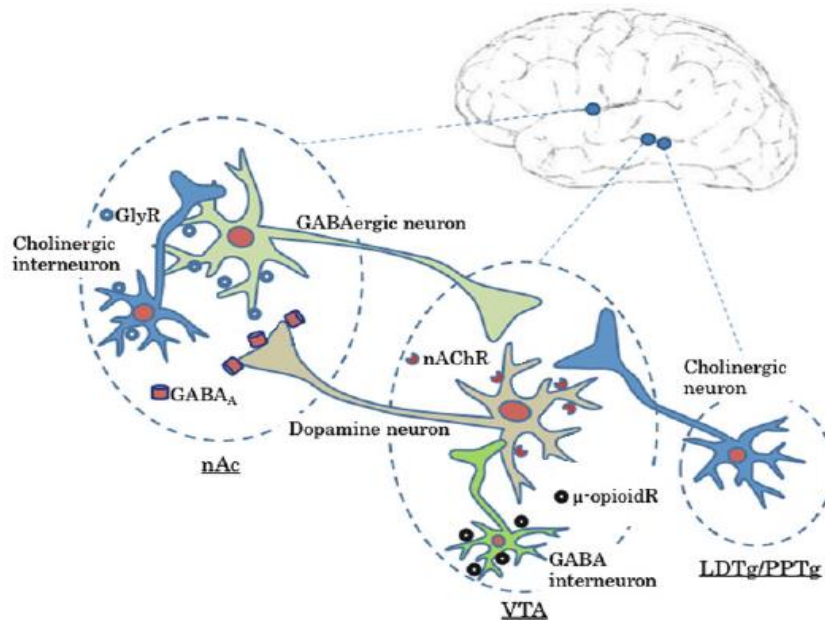


Figura 1. Sistema mesolímbico dopaminérgico. nAc = núcleo accumbens, VTA = área tegmental ventral, LDTg = núcleo tegmental laterodorsal, PPTg = núcleo pedunculopontino, GlyR = receptor de glicina, nAChR = receptor nicotínico de acetilcolina, GABA_A = receptor de GABA tipo A, μ-opioidR = receptor opioide tipo μ. Modificado de Söderpalm y Ericson (2011).

Una propuesta que explicaría los efectos placenteros del alcohol y la activación del sistema mesolímbico dopaminérgico, es la capacidad del etanol de activar receptores de

glicina inhibitorios presentes en las neuronas GABAérgicas del nAc. Análisis de western blot, han mostrado la presencia de receptores de glicina (GlyR) en el nAc de ratas (Molander y Söderpalm, 2005a). Estudios de microdiálisis, realizados también en ratas, han mostrado que la perfusión en el nAc del antagonista glicinérgico estriquina, bloquea la liberación de dopamina inducida por etanol en la misma región (Molander y Söderpalm, 2005b; Jonsson y cols., 2014). Además, la perfusión de etanol directamente en el VTA no aumenta la liberación de DA en nAc, mientras que la perfusión de etanol en nAc sí lo hace (Löf y cols. 2007), sugiriendo que el alcohol aumenta la liberación de dopamina en nAc mediante la posible activación de GlyR en el nAc.

Experimentos en animales, también han mostrado que la perfusión del antagonista colinérgico mecamilamina en el VTA, bloquea la liberación de dopamina inducida por la administración de etanol, lo que no ocurre al perfundir el antagonista colinérgico en el nAc (Ericson y cols., 2003), sugiriendo que los efectos estimulantes del etanol en el sistema mesolímbico involucran indirectamente la activación de neuronas colinérgicas.

Sin embargo, también es posible una acción directa del etanol sobre las neuronas colinérgicas provenientes del tegmento laterodorsal, ya que se ha observado que el consumo voluntario de alcohol aumenta la liberación de acetilcolina en VTA en paralelo con aumentar la dopamina en nAc (Larsson y cols., 2005).

En base a estos antecedentes, se ha hipotetizado que la activación del sistema mesolímbico se debe a que el etanol activa los GlyR presentes en las neuronas GABAérgicas del nAc, lo que disminuiría la regulación negativa que estas neuronas ejercen sobre las proyecciones axonales de neuronas colinérgicas en el VTA, potenciando la activación colinérgica, que a su vez activaría las neuronas dopaminérgicas que se proyectan sus axones al nAc (Söderpalm y cols., 2009; Söderpalm y cols., 2017). En la **Figura 2**, se muestra un esquema propuesto para la activación del sistema mesolímbico por la acción del etanol sobre los receptores de glicina.

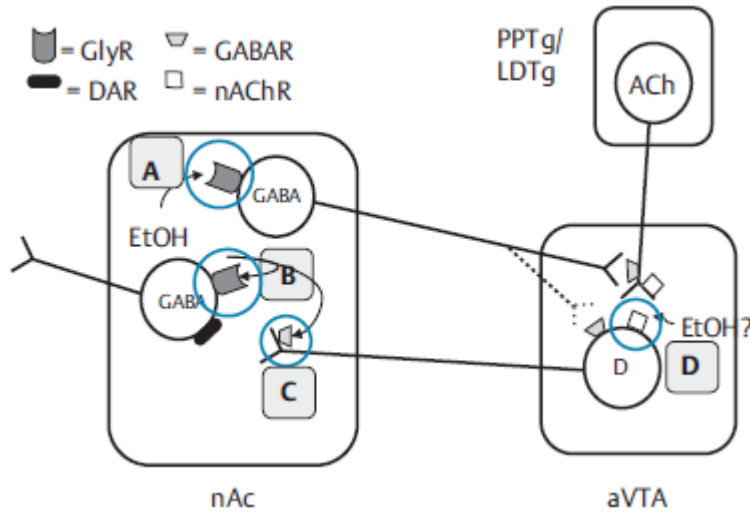


Figura 2. Principales participantes en la activación del sistema mesolímbico mediado por el alcohol. nAc = núcleo accumbens, VTA = área tegmental ventral, LDTg = núcleo tegmental laterodorsal, PPTg = núcleo pedunculopontino, GlyR = receptor de glicina, nAChR = receptor nicotínico de acetilcolina, GABAR = receptor de GABA, DAR = receptor de dopamina. El etanol interactuaría en el nAc con **A**: GlyR de neuronas GABAérgicas que proyectan sus axones hacia el VTA, **B**: GlyR de neuronas espinosas medias y **C**: GABAR presinápticos de axones en neuronas dopaminérgicas. Además, interactuaría con **D**: nAChR en el VTA. Obtenida de Söderpalm y cols. (2009).

1.5. El receptor de glicina

La glicina es el principal neurotransmisor inhibitorio en la médula espinal (ME) y del tronco encefálico (TE) (Aprison y cols., 1968). La transmisión glicinérgica en estas regiones está involucrada en el control de la transmisión del dolor, ritmo respiratorio, coordinación motora, respuesta refleja y procesamiento sensorial (Burgos y cols., 2015).

El receptor de glicina (GlyR), es un receptor inhibitorio de la familia *cys-loop* de canales iónicos dependientes de ligando constituido por 5 subunidades, de las que se conocen 5 subtipos en mamíferos: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ y β , las cuales forman un canal permeable a Cl^- el que puede ser del tipo homopentamérico o heteropentamérico (Lynch, 2009).

La subunidad $\alpha 1$ se expresa en niveles bajos en embriones, mientras que en adulto se expresa ampliamente en el sistema nervioso central (SNC). La subunidad $\alpha 2$ se expresa en niveles altos durante el desarrollo embrionario en ME, TE y algunas regiones del prosencéfalo (corteza, hipocampo y tálamo), en contraposición a las etapas avanzadas del

desarrollo, donde su nivel comienza a descender. La subunidad $\alpha 3$ se expresa después de la tercera semana postnatal de forma reducida en el hipocampo, retina y en la médula espinal. La subunidad $\alpha 4$ es un pseudo gen en humanos (Aguayo y cols., 2004; Lynch, 2009; Burgos y cols., 2016), sin embargo, en otras especies es un gen funcional (Harvey y cols., 2000). La subunidad β posee funciones estructurales, ya que en las sinapsis se une a gefirina, proteína de anclaje post-sináptico, y también presenta funciones regulatorias de la respuesta a agonistas y moduladores del GlyR (Meyer y cols., 1995; Burgos y cols., 2015). La subunidad α es necesaria para formar receptores funcionales, no así la subunidad β (Griffon y cols., 1999; Borman y cols., 1993).

Cada subunidad del GlyR funcional está compuesta por un extenso dominio extracelular N-terminal que posee un sitio de unión a ligando, cuatro dominios transmembrana (TM 1-4), un dominio intracelular entre los dominios transmembrana 3 y 4 (IL), y un pequeño dominio extracelular C-terminal (**Figura 3A**). En el receptor pentamérico, el dominio TM-2 de las subunidades dan la forma al canal iónico permeable a Cl^- , mientras que TM-4 forma la cara externa del receptor y enfrenta a la membrana plasmática (**Figura 3B**) (Burgos y cols., 2016).

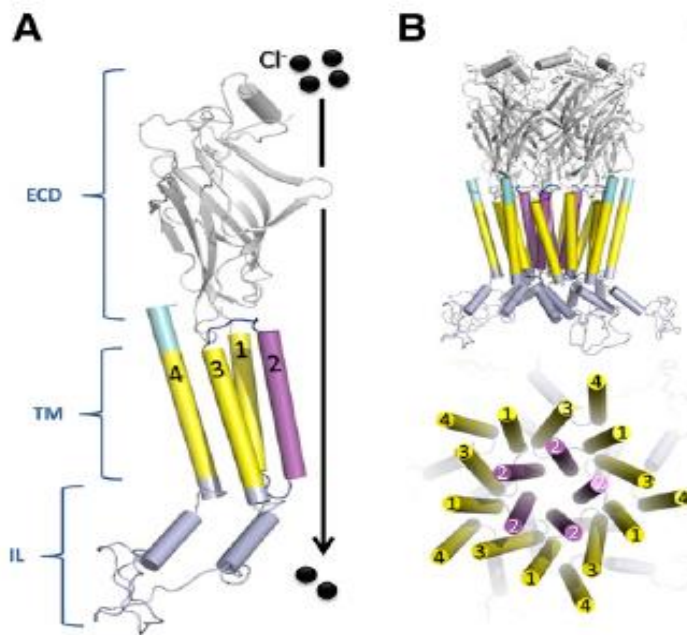


Figura 3. Estructura del receptor de glicina. A) Representación de un monómero (alfa o beta) de GlyR. B) Conformación pentamérica del receptor funcional. ECD = dominio extracelular, TM = dominio transmembrana, IL = dominio intracelular. Obtenido de Burgos y cols. (2016).

1.6. Farmacología y toxicología del receptor de glicina.

El principal agonista fisiológico del GlyR es el neurotransmisor natural glicina (Burgos y cols., 2015). La glicina es el aminoácido más simple ya que en este la cadena lateral está constituida por un átomo de hidrógeno.

Existe poca información sobre el metabolismo de la glicina en el SNC, pero hay evidencia de que se sintetizaría principalmente a partir del aminoácido serina, proceso que es catalizado por las enzimas del complejo glicina descarboxilasa (mitocondria) o por la serina hidroximetiltransferasa (citosol). Otro precursor de glicina es el glioxilato, el que es convertido a glicina por enzimas glioxilato aminotransferasas (Hernandes y Troncone, 2009). En la **Figura 4** se esquematiza el metabolismo de la glicina.

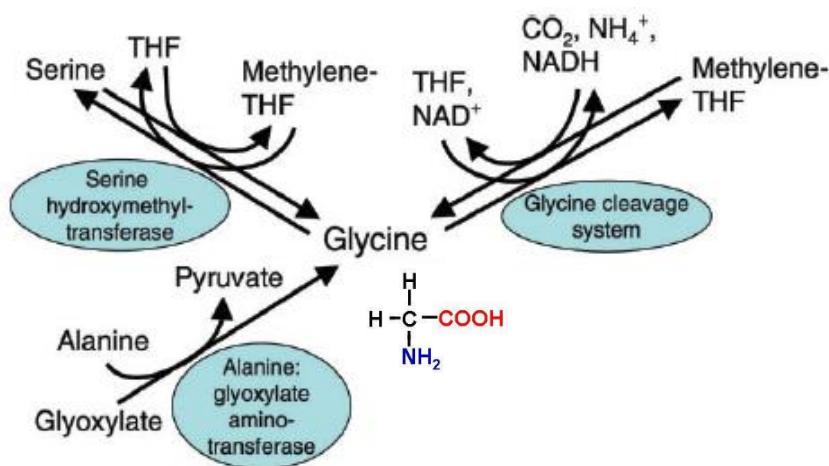


Figura 4. Biosíntesis y metabolismo de la glicina. THF = tetrahidrofolato, NAD^+ = nicotinamida adenina dinucleótido oxidado, NADH = nicotinamida adenina dinucleótido reducido. Adaptado de Petrat y cols. (2012).

La glicina es almacenada en vesículas por el transportador vesicular de aminoácidos inhibitorios (VIAAT), transportador que es compartido con GABA (Aubrey, 2016; Legendre, 2001). Se ha observado que la toxina tetánica, una proteasa que degrada selectivamente a sinaptobrevina (proteína que controla la fusión vesicular durante la exocitosis), bloquea la liberación de glicina, lo que sugiere que sinaptobrevina posee un rol fundamental en la liberación de glicina en los terminales presinápticos (Legendre, 2001; Huttner, 1993). Una vez liberada la glicina al espacio sináptico producto de un potencial de

acción, es removida por transportadores de glicina (GLYT), de los cuales se conocen 2 variantes, GLYT1 y GLYT2. GLYT1 se expresa principalmente en astrocitos y es bloqueado por sarcosina (N-metilglicina), mientras que GLYT2 se ubica en terminales presinápticos en neuronas glicinérgicas y es inhibido selectivamente por amoxapina (Hernandes y Troncone, 2009; Legendre, 2001). En la **Figura 5** se esquematiza los componentes de la sinapsis glicinérgica.

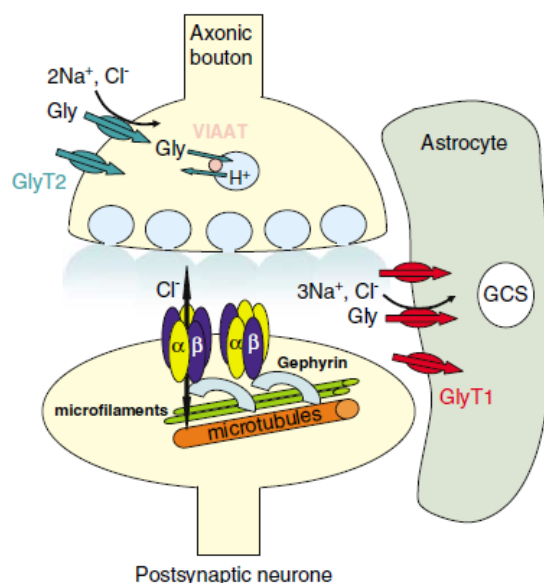


Figura 5. Esquema de la sinapsis glicinérgica. Gly = glicina, VIAAT = transportador vesicular de aminoácidos inhibitorios, GlyT1 = transportador de glicina tipo 1, GlyT2 = transportador de glicina tipo 2, GCS = complejo glicina descarboxilasa. Obtenido de Bowery y Smart (2006).

Además de la glicina, son agonistas de GlyR la β -alanina, el ácido γ -amino butírico (GABA) y la taurina, todos con menor potencia que la glicina en la activación de GlyR. Por otra parte, se han descrito antagonistas del GlyR, los cuales no tienen uso clínico y son utilizados principalmente como herramientas farmacológicas en investigación. La estricnina, es un alcaloide altamente tóxico, que se obtiene del árbol de la nuez vómica, el cual actúa como un potente antagonista competitivo de la glicina, el cual se usa para discriminar entre sinapsis GABAérgicas y glicinérgicas debido a su alta selectividad por el GlyR. La picrotoxina, es un tóxico que actúa como antagonista no competitivo de receptores tipo canales iónicos dependientes de ligando, entre ellos el receptor $GABA_A$ y los GlyR, pero con menor afinidad (Burgos y cols. 2015).

1.7. Efectos del etanol en el GlyR.

Se ha demostrado que el alcohol potencia la función glicinérgica en diversos sistemas experimentales. En cultivos primarios de neuronas de médula espinal, se ha observado que la incubación con etanol (1-425 mM) aumenta la afinidad de GlyR por la glicina (Aguayo y cols., 1996). Estos resultados se han replicado en cultivo de neuronas de hipocampo (Aguayo y Pancetti, 1994), en ovocitos de *Xenopus laevis* que expresan el GlyR homomérico (tanto $\alpha 1$ como $\alpha 2$) (Mascia y cols., 1996) y en motoneuronas hipoglosas (Eggers y cols., 2000).

Se han propuesto 2 mecanismos para explicar los efectos potenciadores del alcohol sobre la transmisión glicinérgica: El primero de ellos propone una interacción directa del etanol con la subunidad $\alpha 1$ del receptor de glicina. Estudios de mutagénesis *in vitro*, han mostrado que el alcohol se une a un bolsillo formado por aminoácidos ubicados en el dominio transmembrana 2 (TM-2) y el dominio transmembrana 3 (TM-3), sitios que también están involucrados en la acción farmacológica de los anestésicos halogenados sobre el GlyR (Söderpalm y cols., 2017). Los resultados de estos estudios muestran que los residuos aminoacídicos alanina 52 (N-terminal), serina 267 (TM-2) y alanina 288 (TM-3) son fundamentales para la modulación de GlyR por etanol a altas concentraciones (200 mM) (Mihic y cols., 1997; Lobo y cols., 2004 Crawford y cols., 2007). El segundo mecanismo propuesto, plantea que hay una potenciación indirecta del alcohol, en rangos de concentraciones farmacológicamente relevantes (10-100 mM), sobre la transmisión glicinérgica, a través de la activación de la vía de transducción constituida por la proteína G heterotrimérica (Yevenes y cols., 2008). Estudios electrofisiológicos, han demostrado que GTP- γ -S, un activador no hidrolizable de la proteína G, potencia la corriente glicinérgica en cultivos de neuronas espinales (Aguayo y cols., 1996). Posteriormente, se encontró que la perfusión intracelular del dímero $\beta\gamma$ de la proteína G (G- $\beta\gamma$) potencia la corriente glicinérgica, lo cual es inhibido por la sobreexpresión de la subunidad α de proteína G (G- α) y por la transfección de ct-GRK2, una quinasa que fosforila receptores acoplados a proteína G y los desacopla de su interacción con la proteína G (Yevenes y cols., 2003). Por lo tanto, G- $\beta\gamma$ sería el responsable de la potenciación de GlyR mediante una interacción a nivel de señalización intracelular. Luego se demostró por mutagénesis

sitio dirigida que dos grupos de aminoácidos básicos en el dominio IL de la subunidad $\alpha 1$ (316RFRRK320 y 385KK386) del GlyR son fundamentales para su potenciación por G- $\beta\gamma$ (Yévenes y cols., 2006). La expresión de GlyR con mutaciones en esos residuos aminoacídicos han mostrado ser incapaces de ser potenciados por etanol (Yévenes y cols., 2008). Los grupos de residuos de aminoácidos básicos demostraron ser etanol-específicos, ya que la substitución con alanina del motivo 385KK386 disminuye la sensibilidad por etanol sin alterar la potenciación inducida por anestésicos generales (Yévenes y cols., 2008). Además, la administración de un péptido pequeño diseñado en base al dominio 385KK386 de GlyR y que presenta afinidad por G- $\beta\gamma$, inhibe la potenciación de GlyR mediada por etanol (Guzmán y cols., 2009). En base a estos antecedentes, se plantea que los efectos del etanol en la potenciación de la transmisión glicinérgica, estarían mediados por la interacción de G- $\beta\gamma$ con el dominio intracelular del GlyR.

1.8. Receptor de glicina y alcoholismo.

Se ha asociado al GlyR con los efectos sedativos y de descoordinación motora generados por el alcohol, así como también en la apetencia por el consumo de alcohol en ratones (Blednov y cols., 2012; Findlay y cols., 2005). Estudios realizados por Aguayo y cols. (2014), en ratones que expresaban constitutivamente (*knock-in*, KI) una subunidad $\alpha 1$ humana del GlyR con las mutaciones KK385/386AA, demostraron que las mutaciones en los receptores GlyR de los ratones KI no afectaron su expresión ni su funcionalidad, pero sí presentaban una sensibilidad reducida a los efectos potenciadores del etanol de la transmisión glicinérgica, con respecto a los controles silvestres (*WT*, siglas en inglés). En ensayos de comportamiento, se encontró que ratones KI presentaban un menor tiempo de recuperación de la pérdida del reflejo de enderezamiento (LORR en siglas en inglés) inducido por dosis intoxicantes de etanol (3,5 g/kg) (**Figura 6**), sugiriendo que los efectos sedativos del alcohol estarían en parte asociados a la expresión de la subunidad $\alpha 1$ de GlyR (Aguayo y cols., 2014).

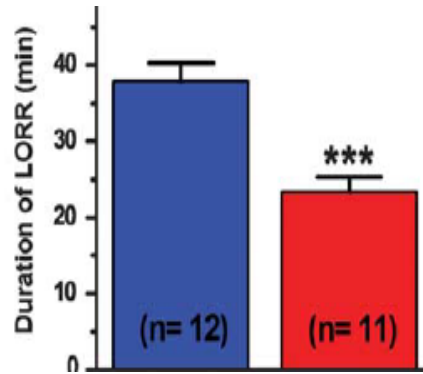


Figura 6. Duración de la pérdida del reflejo de enderezamiento (LORR) producida por 3,5 g/kg de etanol. *WT* = ratones silvestres, *KI* = ratones *knock in*. Obtenido de Aguayo y cols. (2014).

Datos publicados por el mismo grupo (Muñoz y cols., 2019), indican que ratones *KI* con mutaciones KK385/386AA en $\alpha 1$ de GlyR, presentan un mayor consumo voluntario de alcohol comparado con ratones *WT* y también un aumento de la preferencia de lugar inducida por alcohol, mostrando que los GlyR también estarían involucrados en los efectos motivacionales del alcohol, y específicamente se verían aumentados frente a una subunidad $\alpha 1$ mutada. No obstante, aún queda por dilucidar qué región cerebral es responsable de estos efectos, ya que los ratones *KI* expresan la subunidad $\alpha 1$ en todo el sistema nervioso central. Recientemente, se encontró que en neuronas GABAérgicas del nAc, los GlyR están formados principalmente por subunidades del tipo $\alpha 1$ (Förstera y cols. 2017). Por lo tanto, se podría hipotetizar que el aumento en el consumo voluntario de alcohol observado en los ratones *KI*, podría deberse a un mecanismo compensatorio en respuesta a una menor liberación de dopamina en el VTA inducida por etanol. Este efecto se podría explicar por una menor potenciación por etanol de la actividad inhibitoria de los GlyR mutados presentes en neuronas GABAérgicas del nAc, las que se proyectan al VTA y controlan negativamente a las neuronas colinérgicas presentes en este núcleo (**Figura 2**). La inhibición de las neuronas colinérgicas del VTA resultaría en una menor activación de las neuronas dopaminérgicas del VTA y en una menor liberación de dopamina en el nAc. Como apoyo a esta hipótesis, se ha observado que la perfusión de glicina (100 μ M) en el nAc de ratas, genera un aumento en los niveles de dopamina en nAc, junto con una disminución en la preferencia y consumo de alcohol (Molander y cols., 2005). Además, la administración sistémica de Org25935, un potente inhibidor de GLYT1, aumenta los

niveles de glicina extracelular en el cerebro y reduce la preferencia y consumo de alcohol en ratas (Molander et al., 2007). Sin embargo, para comprobar esta hipótesis es necesaria otra estrategia experimental que permita expresar selectivamente la subunidad $\alpha 1$ (KK385/386AA) que confiere menor sensibilidad al GlyR por etanol, en las neuronas GABAérgicas del nAc.

1.9. Sistema Cre-loxP.

Para estudiar el rol de la subunidad $\alpha 1$ de GlyR en los efectos del alcohol sobre las neuronas GABA del nAc, hay que diseñar un método experimental que permita la expresión específica de la subunidad $\alpha 1$ (KK385/386AA) en este núcleo del sistema mesolímbico.

Una estrategia es el uso del sistema Cre/loxP, que se basa en la actividad recombinante de la proteína Cre del virus bacteriófago P1, la cual es capaz, entre otras recombinaciones, de invertir segmentos genéticos flanqueados por sitios de reconocimientos de Cre de 34 pares de base, denominados *loxP*, cuando estos están ubicados en orientaciones opuestas. Por lo tanto, si un gen de interés tiene su marco abierto de lectura en sentido inverso con respecto al de su promotor, y es flanqueado por sitios *loxP*, sólo se va a expresar en células que produzcan la proteína Cre (Kühn y Torres, 2002) (**Figura 7**).

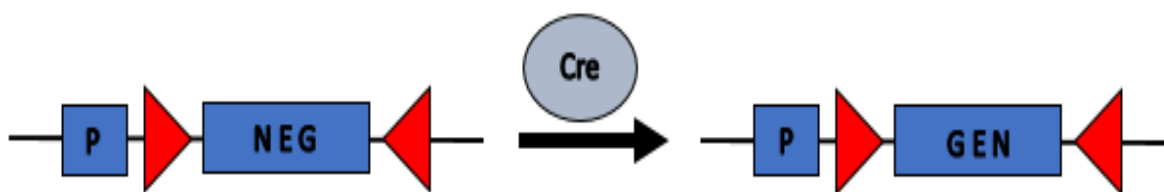


Figura 7. Esquema que indica la inversión mediada por el sistema Cre/loxP. Las puntas de flechas rojas representan a los sitios *loxP*. P = promotor del gen, NEG = gen invertido, GEN = gen funcional. Adaptada de Kühn y Torres (2002).

En el laboratorio del Dr. Luis Aguayo en la Universidad de Concepción, se dispone de ratones que expresan la recombinasa Cre en neuronas GABAérgicas D1 del cuerpo estriado cerebral, incluyendo el nAc (ratones transgénicos D1-Cre) (Gensat, id: EY217; <http://www.gensat.org/cre.jsp>). Por lo tanto, la generación y administración en el nAc, de

un vector codificante de la subunidad $\alpha 1$ (KK385/386AA) flanqueada por sitios *loxP* invertidos, permitiría expresar selectivamente el gen de interés en este núcleo, sin afectar otras regiones cerebrales a las que el vector pudiese difundir.

Los virus adenoasociados (AAV) aparecen como una herramienta adecuada para este propósito, ya que las versiones recombinantes de estos virus se utilizan ampliamente para la transferencia de genes en el SNC, debido a que no generan respuesta inmune y poseen una expresión prolongada en el tiempo del gen de interés (Howarth y cols., 2010). Estas características de los AAV, los hacen un candidato ideal para la realización de pruebas *in vivo*, destinadas a estudiar el rol de la subunidad $\alpha 1$ (KK385/386AA) en los efectos farmacológicos y toxicológicos del alcohol. Ya se cuenta en el laboratorio con un plásmido adenoasociado (pAAV-DIO-GlyR-mCitrine), que contiene un casete invertido con la secuencia del cDNA de la subunidad $\alpha 1$ de GlyR y del reportero fluorescente mCitrina, este casete de expresión está flanqueado por sitios *loxP* y su expresión controlada por el promotor de la sinapsina 1 humana.

2. HIPÓTESIS

La generación de un vector viral adenoasociado (AAV) codificante de la subunidad $\alpha 1$ mutada (KK385/386AA) del receptor de glicina (GlyR), flanqueada por sitios *loxP* invertidos, permite la expresión específica de un GlyR funcional en células que expresan la recombinasa Cre.

3. OBJETIVO GENERAL

Generar un vector AAV que codifique para la subunidad $\alpha 1$ del receptor de glicina humano mutado (KK385/386AA) y que lo exprese sólo en células que expresen la recombinasa Cre.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.1.** Introducir mediante mutación sitio dirigida, los cambios aminoacídicos KK385/386AA en el cDNA del gen de la subunidad $\alpha 1$ de GlyR.
- 4.2.** Incorporar los cDNA de los genes silvestre y mutado de GlyR en plásmidos adenoasociados Cre-dependientes.
- 4.3.** Determinar mediante RT-PCR, inmunocitoquímica y electrofisiología si estos plásmidos precursores de vectores AAV, expresan una proteína funcional en células en cultivo bajo un contexto Cre.

5. MATERIALES

5.1. Material biológico.

5.1.1. Líneas celulares.

Se utilizaron dos líneas celulares: HEK-293 (ATCC CRL-1573) de riñón de embrión humano, proveniente de American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE. UU. y PC-12 (ATCC CRL-1721) de feocromocitoma de rata, amablemente proporcionada por la Dra. Lisette Leyton, Laboratorio de Comunicaciones Celulares, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

5.1.2. Cepas de *Escherichia coli*.

DH5 α : cepa con baja capacidad de recombinación (recA1), obtenidas del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

5.2. Reactivos.

5.2.1. Enzimas.

De Thermo Scientific (Waltham, MA, EE. UU.): NheI (#ER0971), Eco147I (#ER0421), SacII (#ER0201), Transcriptasa Inversa (#4368814); de Fermentas (Waltham, MA, EE. UU.): BamHI (#ER0051), EcoRI (#ER0271), SalI (#ER0641), PstI (#ER0611), SacI (#ER1131), HindIII (#ER0501), DNA ligasa del fago T4 (#EL0011, #EL0013); de Promega (Madison, WI, EE. UU.): EcoRV (#R635A); de New England Biolabs (Ipswich, MA, EE. UU.): XmaI (#R0180S), Taq DNA polimerasa (#M0267S), fragmento largo de la enzima DNA polimerasa I (fragmento de Klenow) (#M0210S); de Invitrogen (Carlsbad, CA, EE. UU.): DNAsa I (#18068-015).

5.2.2. Anticuerpos.

De Synaptic Systems (Göttingen, Alemania): anticuerpo monoclonal anti GlyR α 1 (ratón, #146111); de Jackson Immuno (West Grove, PA, EE. UU.): anticuerpo policlonal IgG anti ratón conjugado a Cy3 (burro, #715165150).

5.2.3. Reactivos de cultivo celular.

De Gibco BRL (Waltham, MA, EE. UU): medios de cultivo DMEM (#12800017), RPMI-1640 (#31800022) y Optimem 1X (#31985062), tripsina-EDTA 0,25% (#25200072), Suero Fetal Bovino (#10437028) y Suero Equino (#16050122).

5.2.4. Reactivos generales.

De Merck (Darmstadt, Alemania): Cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), fosfato di-ácido de potasio (KH₂PO₄), fosfato ácido de sodio (Na₂HPO₄), Tris-HCl, ácido acético glacial, hidróxido de sodio (NaOH), Dodecilsulfato sódico (SDS), isopropanol, cloroformo, acetato de sodio, etanol, glicerol; de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.): Agar, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), acetato de potasio, Tritón X-100, poli-L-lisina 0,01%; de Invitrogen (Carlsbad, CA, EE. UU.): Lipofectamina 2000, kanamicina, TRIZol, mix de dNTP; de MoBio (Carlsbad, CA, EE.UU.): Medio LB; de Lonza (Cohasset, MN, EE.UU.): Agarosa; de Biotium (Fremont, CA, EE.UU.): GelRed; de Winkler (Lampa, Santiago, Chile): Tris-acetato-EDTA (TAE), fenol saturado básico; de Chemix (Farmalatina, Lampa, Santiago, Chile): Ácido clorhídrico (HCl); de Riedel de Haen (Seelze, Alemania): bicarbonato de sodio; de Calbiochem (San Diego, CA, EE. U.U.): Mowiol 4-88.

5.3. Plásmidos.

pAAV-DIO-GlyR α 1wt-mCitrine: plásmido de transferencia para la generación de vectores adenoasociados. Tiene un peso de 7495 pb y posee un gen de resistencia a ampicilina. El casete de expresión está constituido por el promotor de sinapsina I, seguido de un sitio de reconocimiento para la recombinasa Cre (*loxP*) y luego en configuración invertida (i) la secuencia del reportero fluorescente mCitrina (716 pb), (ii) una secuencia “internal ribosome entry site” (IRES) y (iii) el cDNA del receptor de glicina tipo α 1 (GlyR α 1) humano (1349 pb) (ref seq NM_000171.3). A continuación, se encuentra otro sitio *loxP* en configuración invertida respecto del primer sitio *loxP*. Este plásmido fue cedido por el Laboratorio de Electrofisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción. (Ver mapa gráfico en **Anexo, Figura A1**).

pLV-Cre: plásmido de transferencia para la generación de vectores lentivirales. Tiene un peso de 9018 pb y posee genes de resistencia a ampicilina y bleomicina. El casete de expresión está constituido por el promotor del citomegalovirus (CMV) seguido de la secuencia de la recombinasa Cre acoplada a una secuencia de señalización nuclear (NLS) (1593 - 2645 pb). Fue adquirido del repositorio Addgene (Watertown, MA, EE.UU., plasmid #12106). (Ver mapa gráfico en **Anexo, Figura A2**).

pAAV-MCS: forma parte del sistema AAV Helper Free (Stratagene). Este plásmido (4,7 kb) contiene el promotor del CMV seguido del intrón de la β -globina humana y otros elementos que permiten un gran nivel de expresión en células de mamífero cuando el transgén es clonado en el sitio de múltiple clonación. Posee un gen de resistencia a ampicilina. (Ver mapa gráfico en **Anexo, Figura A3**).

pAAV-Cre: plásmido derivado de pAAV-MCS. Contiene el cDNA del gen de la recombinasa Cre, bajo el control del promotor del CMV. Construido por Adolfo Maldonado en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, mediante el subclonamiento del fragmento NLS-Cre, obtenido mediante digestión de pLV-Cre con EcoRI y Sall, en el sitio de múltiple clonamiento de pAAV-MCS previamente digerido con EcoRI y Sall. (Ver mapa gráfico en **Anexo, Figura A4**).

pCre-GFP: plásmido de expresión que codifica para la recombinasa Cre. Contiene como reportero el cDNA del gen de la proteína fluorescente verde (GFP). Posee un gen de resistencia a ampicilina. Fue cedido por el Laboratorio de Electrofisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

pAAV-DIO-GlyR α 1mut-mCitrine: plásmido de transferencia para la generación de vectores adenoasociados. Tiene un peso de 7495 pb y posee un gen de resistencia a ampicilina. El casete de expresión está constituido por el promotor de sinapsina I, seguido de un sitio de reconocimiento para la recombinasa Cre (*loxP*) y luego en configuración invertida (i) la secuencia del reportero fluorescente mCitrina (716 pb), (ii) una secuencia “internal ribosome entry site” (IRES) y (iii) el cDNA del receptor de glicina tipo α 1 humano con las mutaciones AA1524/1525GC y AA1527/1528GC (1349 pb). A continuación, se encuentra otro sitio *loxP* en configuración invertida respecto del primer

sitio *loxP*. Este plásmido fue generado por la compañía biotecnológica Genscript (Piscataway, NJ, EE. UU.). (Ver mapa gráfico en **Anexo, Figura A5**).

pAAV-DIO-mCitrine: plásmido de transferencia para la generación de vectores adenoasociados. Tiene un peso de 6140 pb y posee un gen de resistencia a ampicilina. El casete de expresión está constituido por el promotor de sinapsina I, seguido de un sitio de reconocimiento para la recombinasa Cre (*loxP*) y luego en configuración invertida (i) la secuencia del reportero fluorescente mCitrina (716 pb) y (ii) una secuencia IRES. A continuación, se encuentra otro sitio *loxP* en configuración invertida respecto del primer sitio *loxP*. Fue construido por Adolfo Maldonado en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, mediante la escisión del cDNA de GlyR α 1 desde pAAV-DIO-GlyR α 1wt-mCitrine mediante NheI y Eco147I, seguido de tratamiento con el fragmento largo de la polimerasa I (Klenow) y posterior ligación. (Ver mapa gráfico en **Anexo, Figura A6**).

pmCitrine-N1: plásmido de expresión de 4732 pb que posee genes de resistencia a kanamicina y neomicina. El casete de expresión está constituido por el promotor del citomegalovirus (CMV) seguido del cDNA de la proteína fluorescente mCitrina (verde). Fue adquirido del repositorio Addgene (Watertown, MA, EE. UU., plasmid #54594). (Ver mapa gráfico en **Anexo, Figura A7**).

5.4. Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos MR-51 al MR-56 usados para secuenciar en ambas hebras del DNA plasmidial de pAAV-DIO-GlyR α 1wt-mCitrine, en la región comprendida entre las posiciones 3300 pb a 5900 pb del plásmido, se sintetizaron en *Integrated DNA Technologies*, (Iowa, EE. UU.). Los oligonucleótidos MR-52 y MR-56 también se usaron como partidores en reacciones de polimerización en cadena (PCR). Los oligonucleótidos TG-180 y TG-181, usados como partidores en reacciones de PCR, se sintetizaron en la Unidad de Síntesis y Análisis de Biomoléculas del Centro de Equipamiento y Servicios de Apoyo Tecnológico (CESAT), Facultad de Medicina, Universidad de Chile (**Tabla 1**).

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR convencional y RT-PCR.

Partidor	Secuencia 5` - 3`	Sitio de anclaje	Acceso GenBank
MR-51	TTTAAAGGTCCCCAGTGAA	480-499 (h GlyR α 1)	NM_000171.3
MR-52	AGCCTGCTCATTGTCATCCT	1077-1096 (h GlyR α 1)	NM_000171.3
MR-53	ATATCGCCCCTCTCCCTC	5144-5162 (pAAV-DIO-GlyR α 1wt- mCitrine)	-----
MR-54	GCAGGAAGATGTTGACCCTA	479-460 (h GlyR α 1)	NM_000171.3
MR-55	GAGCACAGTGGTGATGCCTA	1169-1150 (h GlyR α 1)	NM_000171.3
MR-56	AAAAGACGGCAATATGGTGG	5252- 5233 (pAAV-DIO-GlyR α 1wt- mCitrine)	-----
TG-180	GCATTGTAACCAACTGGGACG	299-319 (r β -actina)	NM_031144.3
TG-181	CATGAGGTAGTCTGTCAGGTC	648-628 (r β -actina)	NM_031144.3

6. MÉTODOS

6.1. Secuenciación de DNA del plásmido pAAV-DIO-GlyR α 1wt-mCitrine.

El plásmido pAAV-DIO-GlyR α 1wt-mCitrine se secuenció en el Servicio de Secuenciación de la Pontificia Universidad Católica de Chile, usando los partidores MR-51, MR-52, MR-53, MR-54, MR-55 y MR-56, los que fueron enviados en una concentración de 10 μ M. El plásmido pAAV-DIO-GlyR α 1wt-mCitrine se purificó de acuerdo con las instrucciones indicadas en el kit de extracción de plásmidos E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini Kit de Omega Biotek (Georgia, EE. UU.) y se envió una alícuota de concentración de 100 ng/ μ l. El equipo utilizado fue un secuenciador ABI PRISM 3500XL (electroforesis capilar) usando el sistema de marcación Big Dye Terminator v3.1 de Applied Biosystems (Foster City, CA, EE. UU.).

6.2. Transformación de bacterias.

Para la amplificación de los plásmidos, se transformó bacterias *E. coli* DH5 α quimiocompetentes bajo el procedimiento que se indica a continuación: bajo condiciones estériles (mechero) se mezclaron 0,1 μ g de plásmido con 100 μ L de bacterias *E. coli* DH5 α competentes. Luego, la mezcla plásmido/bacterias se incubó durante 30 minutos en hielo.

Posteriormente, se aplicó un *shock* térmico a 42°C durante 2 minutos. Finalizado el shock térmico, se tomó la mezcla plásmido/bacterias y se traspasó a un tubo de cultivo estéril con 900 μ L de medio LB sin antibióticos, el cual se incubó a 37°C durante 90 minutos con agitación a 250 rpm. Una vez acabado el tiempo de incubación, se tomaron 200 μ L de la suspensión de células para sembrar una placa de agar/LB con el antibiótico correspondiente, la que se incubó de forma invertida a 37°C durante toda la noche.

6.3. Purificación de plásmidos.

6.3.1. Mediante kit comercial.

Una colonia aislada picada de una placa de agar/LB con antibiótico se sembró en un tubo de cultivo estéril con 3 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente, y se incubó a 37°C con agitación a 250 rpm durante toda la noche. Al día siguiente, el cultivo saturado resultante se utilizó para inocular un matraz de cultivo conteniendo 50 ml de medio LB con

el antibiótico correspondiente, y se incubó a 37°C con agitación a 250 rpm durante toda la noche. Luego se extrajo y purificó el DNA plasmidial del cultivo bacteriano de acuerdo con las instrucciones indicadas en el kit de extracción de plásmidos E.Z.N.A. Plasmid DNA Midi Kit de Omega Biotek (Georgia, EE. UU.).

6.3.2. Amplificación de plásmidos mediante método de Begbie modificado.

Se utilizó una modificación del método de Begbie y cols. (2005), para la amplificación de plásmidos. Se inoculó 6 ml de medio LB con ampicilina con una muestra de *E. coli* DH5 α transformadas con pLV-Cre y se incubó a 37°C con agitación a 250 rpm durante 7 horas. Luego, se agregó 200 μ l del inóculo anterior a un tubo con 3 ml de medio LB con ampicilina, y se añadió cloranfenicol a una concentración de 3 μ g/ml y se incubó a 37°C con agitación a 250 rpm durante toda la noche. El plásmido se purificó mediante lisis alcalina de mini preparación (cultivos bacterianos de volúmenes menores o iguales a 3 ml)

6.3.3. Amplificación de plásmidos mediante método de Maniatis modificado.

Se utilizó una modificación del método descrito en Maniatis (Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T., 1989) para la amplificación de plásmidos. Se inoculó 4 ml de medio LB con ampicilina con una muestra de *E. coli* DH5 α transformadas con pLV-Cre y se incubó a 37°C con agitación a 300 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,4. Luego, se añadió cloranfenicol a una concentración de 170 μ g/ml. Luego se incubó a 37°C con agitación a 250 rpm durante toda la noche. El plásmido se purificó mediante lisis alcalina de mini preparación.

6.3.4. Purificación de plásmidos mediante lisis alcalina de mini preparación.

El cultivo saturado con bacterias transformadas se centrifugó a 5000 x g durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y el precipitado de células se suspendió en 200 μ L de solución de suspensión (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8, RNasa A 10 μ g/ μ L) mediante vórtex. Luego, se agregó 200 μ L de solución de lisis (NaOH 0,2 N, SDS 1%), se invirtió repetidamente hasta lograr una mezcla homogénea y se agregó 200 μ L de solución de precipitación (acetato de potasio 5 M, ácido acético glacial 2 M). La mezcla se homogenizó mediante inversión y se centrifugó a 15.000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se traspasó el sobrenadante a un microtubo

de 1,5 ml, se agregó 500 μ L de isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó a 15.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante, el precipitado se suspendió en 500 μ L de etanol 70% y se centrifugó a 15.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se secó al vacío durante 20 minutos. Una vez seco el precipitado, se disolvió en 50 μ l de agua nanopura y se almacenó a -20°C.

6.3.5. Purificación de plásmidos mediante lisis alcalina de mini preparación.

Este método se utilizó para purificar plásmidos de cultivos saturados de volumen mayor a 100 mL. Se usó el mismo protocolo de la mini preparación, exceptuando que se aumentó el volumen de las soluciones de suspensión, de lisis y de precipitación, a 4 ml cada una, y el volumen de elución en agua nanopura a 500 μ l. Luego se trató el plásmido con ARNasa a una concentración de 100 μ g/ml y se incubó a 37°C durante 2 horas. Después se agregó 1 volumen de fenol:cloroformo 1:1 (pH 8) y se centrifugó a 15.000 x g durante 5 minutos. Se extrajo la fase acuosa, y se agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto, y se incubó a -80 °C por 30 minutos. Luego la mezcla se centrifugó a 15.000 x g durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante, se lavó el precipitado con 500 μ l de etanol 70% y se centrifugó a 15.000 x g durante 5 minutos. Luego, se descartó el sobrenadante y se secó el precipitado al vacío durante 20 minutos. Finalmente, se disolvió el precipitado en 100 μ l de H₂O nanopura.

6.4. Determinación de la concentración de las soluciones de plásmido.

La determinación de la concentración de plásmido se realizó mediante espectrofotometría a 260 nm. Para ello se cargó en duplicado 2 μ l de plásmido en la microplaca Take3 (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA) y se midió la absorbancia en el lector de microplaca Epoch (Biotek Instruments). La concentración de plásmido se expresó en términos de ng/ μ L.

6.5. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

Para la caracterización de los plásmidos y visualización de productos de PCR se utilizó la técnica de electroforesis en gel de agarosa. Para el primer caso, se preparó un gel de agarosa al 0,8% y para el segundo, al 1,1% y al 1,5% (disuelto en TAE 1X). Luego de

suspender la agarosa con TAE 1X, la mezcla se homogenizó mediante microondas. Luego se vertió 30 ml de la solución de agarosa en un molde plástico, y se introdujo una peinetas plástica para la formación de 8 pocillos de 0,15 cm de ancho, 0,7 cm de largo y 0,6 cm de alto (63 µl volumen total). Después de la gelificación de la solución de agarosa, el molde se sumergió en una cámara que contenía tampón TAE 1X suficiente para cubrir el gel. En los pocillos se cargó la mezcla de DNA y tampón de carga 6X (0,03% azul bromofenol, 0,03% xileno cianol, glicerol 60%, EDTA 60 mM pH 7,6) en una relación 5:1, respectivamente. Luego, se inició la electroforesis horizontal en las siguientes condiciones: para el gel al 0,8% y al 1,1% la corrida se realizó a 100 voltios durante 60 minutos, para el gel al 1,5% la corrida se realizó a 90 voltios durante 90 minutos. Terminado el tiempo de corrida se llevó el gel a una cámara de revelado que contenía 100 mL de TAE 1X y GelRed® (1X) durante 20 minutos. Luego las bandas de DNA se observaron mediante iluminación UV y posterior registro fotográfico con una cámara CANON PowerShot G16.

6.6. Cultivo de células eucariontes.

6.6.1. Cultivo de células HEK-293.

Las células HEK-293 se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 1,5 g/L de NaHCO₃, esterilizado mediante filtros de nitrocelulosa de 0,2 µm (Sartorius Stedim, Göttingen, Alemania) y complementado con 100 U/mL de penicilina; 0,1 mg/mL de estreptomina. Para la preparación del medio de cultivo completo, se añadió suero fetal de bovino al 10%. Las células se incubaron en placas de poliestireno de 100 x 20 mm (Corning, Corning, NY, EE. UU.), en un incubador Series 8000 WJ Thermo Scientific (Waltham, MA, EE. UU.) a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂. Una vez que las células alcanzaron 80% de confluencia se procedió a su traspaso para un nuevo ciclo de cultivo. Para ello, se retiró el medio de cultivo, se agregó 1 ml de tripsina-EDTA 0,25% y se incubó a 37°C durante 3 minutos. A continuación, se agregó 4 ml de medio de cultivo completo para inactivar la tripsina y mediante pipeteo se desprendieron completamente las células de la placa. Las células se traspasaron en cantidad adecuada a una nueva placa de cultivo conteniendo 13 ml de medio de cultivo completo. Después, se incubó la placa a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂.

6.6.2. Cultivo de células PC-12.

Las células PC-12 se cultivaron en medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640, suplementado con 2 g/L de NaHCO₃, esterilizado mediante filtros de nitrocelulosa de 0,2 µm y complementado con 100 U/mL de penicilina; 0,1 mg/mL de estreptomina. Para la preparación del medio de cultivo completo, se añadió suero de equino al 10% y suero fetal de bovino al 5%. Las células se incubaron en placas de poliestireno de 100 x 20 mm previamente tratadas con poli-L-lisina 0,01%, en un incubador Series 8000 WJ Thermo Scientific a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂. Una vez que las células alcanzaron 80% de confluencia se procedió a realizarles un traspaso con el mismo protocolo que se usó con las células HEK-293.

6.7. Generación de plásmidos.

6.7.1. Generación de pAAV-Cre.

Utilizando los sitios EcoRI y SalI que flanquean el cDNA de NLS-Cre en el plásmido pLV-Cre, se subclonó este cDNA en el vector de expresión pAAV-MCS previamente digerido con EcoRI y SalI. Para ello, se digirieron por separado 60 µg de pLV-Cre y 40 µg de pAAV-MCS, con 8 U de EcoRI a 37 °C durante 16 horas en 100 µl de Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, Tritón X-100 al 0,02%, y BSA 0,1 mg/ml (tampón EcoRI 10X Fermentas). Posteriormente, para cambiar el tampón de reacción, se agregó 1/10 volumen de acetato de sodio 3M, 2 volúmenes de etanol 100% y se incubó a -80 °C por 30 minutos. Luego la mezcla se centrifugó a 15.000 x g por 15 minutos. Se descartó el sobrenadante, se lavó el precipitado con 500 µl de etanol 70% y se centrifugó a 15.000 x g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se secó el precipitado al vacío durante 20 minutos. Finalmente, se disolvió el precipitado en 50 µl de H₂O nanopura. Después, los fragmentos de DNA fueron digeridos con 8 U de SalI a 37 °C durante 16 horas en 100 µl de Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM y BSA 0,1 mg/ml (tampón O 10X Fermentas). Los productos obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, incubados con GelRed® 1X y exposición a luz UV.

La reacción de ligación se realizó mezclando el fragmento NLS-Cre de LV-Cre con el vector pAAV-MCS (doblemente digerido con *EcoRI* y *SalI*) en las siguientes proporciones: 7,2:30 ng y 36:30 ng, respectivamente. Luego, se mezcló con 30 U de DNA ligasa del fago

T4 en un volumen final de 20 μ l y se incubó a 22°C durante 1 hora. Luego, se transformó *E. coli* DH5 α quimio competentes con 10 μ L de productos de ligación según el protocolo ya indicado. Se seleccionaron 10 colonias al azar, las cuales se amplificaron y posteriormente se purificaron por lisis alcalina de mini preparación. Para visualizar y seleccionar las colonias ligadas, se realizó una electroforesis de agarosa al 0,8%, se incubó en GelRed® 1X y luego se observó por transiluminación UV. Como control de peso molecular se usó el plásmido pAAV-MCS. La identidad de pAAV-Cre se confirmó mediante análisis de restricción con las enzimas BamHI, PstI y SacI.

6.7.2. Generación de pAAV-DIO-mCitrine.

El plásmido pAAV-DIO-mCitrine se usó como control de transfección. Utilizando los sitios NheI y Eco147I que flanquean el cDNA de GlyR α 1 en pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine, se escindió este cDNA para generar el plásmido control pAAV-DIO -mCitrine. Para ello, se digirió 1 μ g de pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine con 5 U de NheI a 37 °C durante 6 horas en 100 μ l de Tris-acetato 33 mM (pH 7.9), acetato de magnesio 10 mM, acetato de potasio 66 mM y BSA 0,1 mg/mL (tampón Tango 10X, Thermo Scientific). Posteriormente, para cambiar el tampón de reacción, se agregó 1/10 volumen de acetato de sodio 3 M, 2 volúmenes de etanol 100% y se precipitó mediante el protocolo descrito en 6.7.1. Luego, para volver como el extremo cohesivo generado por NheI, se trató el fragmento de DNA con 1 U de la enzima fragmento largo de la DNA polimerasa I (Klenow) durante 15 minutos a 25 °C en 50 μ l de 50 NaCl mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM (tampón 10X, New England Biolabs) y mix de dNTP 33 μ M (Invitrogen). Se detuvo la reacción agregando EDTA a una concentración final de 10 mM e incubando a 75 °C durante 20 minutos. Después, para cambiar el tampón de reacción, se agregó 1/10 volumen de acetato de sodio 3 M, 2 volúmenes de etanol 100% y se precipitó mediante el protocolo ya descrito. Luego, el fragmento de DNA fue digerido con 5 U de Eco147I a 37 °C durante 16 horas en 100 μ l de Tris-HCl 10 mM (pH 7.5), MgCl₂ 10 mM y BSA 0,1 mg/ml. (tampón 10X, Thermo Scientific). Los productos obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, incubados con GelRed® 1X y exposición a luz UV.

La reacción de auto-circularización del fragmento de DNA se realizó mezclando 40 ng de DNA con 5 U de DNA ligasa del fago T4 en un volumen final de 20 μ l e incubación a 22°C durante 1 hora. Luego, se transformó bacterias *E. coli* DH5 α quimio competentes con 10 μ l de la mezcla de ligación. Luego, se seleccionaron 4 colonias al azar, las cuales se amplificaron y posteriormente se purificaron por lisis alcalina de mini preparación. Para visualizar y seleccionar las colonias ligadas, se realizó una electroforesis de agarosa al 0,8%, se incubó en GelRed® 1X y luego se observó por transiluminación UV. Como control de peso molecular se usó pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine. La identidad de pAAV-DIO-mCitrine se confirmó mediante análisis de restricción con las enzimas SacI, BamHI y HindIII.

6.8. Introducción de cambios aminoacídicos KK385/386AA en el gen de la subunidad α 1 de GlyR mediante mutación sitio dirigida.

Se diseñó una secuencia mutada de GlyR α 1 que incorporaba los cambios nucleotídicos AA1524/1525GC y AA1527/1528GC en el cDNA de GlyR α 1 presente en el plásmido pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine. Para la síntesis del ADN, se envió el diseño electrónico junto a 5 μ g del plásmido pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine purificado por kit comercial E.Z.N.A. Plasmid DNA Midi Kit a la compañía biotecnológica Genscript (New Jersey, EE. UU.).

6.9. Co-transfección de líneas celulares.

6.9.1. Co-transfección mediante polietilenimina (PEI).

El día anterior a la co-transfección se sembró 2 millones de células en una placa de 35 mm de diámetro con 2 ml de medio de cultivo completo. En un microtubo estéril se mezcló 2 μ g de plásmidos totales con un volumen de NaCl 150 mM estéril, suficiente para completar 100 μ l, y en otro microtubo se mezcló 16 μ l de PEI 7,5 mM con un volumen de NaCl 150 mM estéril, suficiente para completar 100 μ l. Ambos tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, luego se mezclaron y se incubaron nuevamente durante 10 minutos a temperatura ambiente. Durante la incubación, se retiró el medio de cultivo de la placa con células y se agregó 1 ml de medio de cultivo con antibióticos y sin suero a 37°C. Luego, se agregó gota a gota la mezcla plásmido-PEI por toda la superficie de la placa y se incubó durante 6 horas a 37°C, en una atmósfera de CO₂ al 5%. Luego de las 6 horas, se

retiró el medio de cultivo de la placa, se agregó 2 ml de medio de cultivo completo y se incubó a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% por 48 horas.

6.9.2. Co-transfección mediante Lipofectamina-2000®.

El día anterior a la co-transfección se sembraron 500.000 células en un pocillo de placa de 12 pocillos Trueline® (Trueline Lab, EE. UU.) con 1ml de medio de cultivo completo. En un microtubo estéril, se mezcló 6 µl de Lipofectamina 2000® con 44 µl de medio Optimem. En otro microtubo estéril, se mezcló 1 µg de plásmidos totales con un volumen de medio Optimem necesario para completar 50 µl. Luego, se agregó la mezcla de plásmido a la mezcla de Lipofectamina 2000®, se homogeneizó y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente. Durante la incubación, se retiró el medio de cultivo del pocillo con células y se le agregó 1 ml de medio RPMI-1640 sin antibióticos ni suero. Transcurridos los 20 minutos, se agregó gota a gota la mezcla plásmido-Lipofectamina 2000® al pocillo con células y se incubó durante 4 horas a 37°C, en una atmósfera de CO₂ al 5%. Luego de las 4 horas, se retiró el medio de cultivo de la placa, se agregó 1 ml de medio de cultivo completo y se incubó a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%, por 96 horas.

6.9.3. Co-transfección mediante electroporación.

Se usó una placa de cultivo celular de 10 cm de diámetro a una confluencia de un 50-70%. Se retiró el medio de cultivo y se lavó con 10 ml de PBS 1X estéril (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, pH 7,4). Luego se retiró el PBS 1X y se agregó 1 ml de tripsina-EDTA y se incubó 2-5 minutos a 37 °C. Se neutralizó la tripsina agregando 10 ml de medio de cultivo completo. Se tomó una alícuota de 10 µl de la suspensión celular y se contó en cámara de Neubauer. Después se centrifugó la suspensión celular a 400 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente para precipitarlas. Se retiró el medio de cultivo y se re-suspendieron las células en medio Optimem a una densidad de 2,5 x 10⁶ células/ml. Luego se agregó 8 µg de plásmido total a una cubeta de electroporación estéril de 0,4 cm de espacio entre los electrodos (BIORAD, Hercules, CA, EE. UU.). A continuación, se agregó 400 µl de suspensión celular a la cubeta y se mezcló el contenido. Se colocó la cubeta en el *ShockPod* del equipo Gene Pulser Xcell™ Electroporation System (BIORAD, Hercules, CA, EE. UU.) y se aplicó un pulso eléctrico de 250 V y 960 µF de capacitancia. Inmediatamente después del pulso, se transfirió las células a una placa de 35

mm de diámetro con 2 ml de medio de cultivo completo. Luego se incubó a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% por 96 horas. El equipo de electroporación Gene Pulser Xcell™, fue amablemente proporcionado por el Dr. Óscar Cerda, del Programa de Biología Celular y Molecular del Instituto de Ciencias Biomédicas (Facultad de Medicina, Universidad de Chile).

6.10. Detección de la fluorescencia de mCitrina en cultivos celulares.

La detección de la fluorescencia verde, emitida por el fluoróforo mCitrina (máx. excitación: 516 nm; máx. emisión: 529 nm), se realizó mediante un microscopio invertido Olympus CKX41 con filtro incorporado IX2-SLP (Shinjuku Monolith, Tokyo, Japan), asociado a una fuente de fluorescencia Olympus U-RFL-T (Shinjuku Monolith, Tokyo, Japón), los cuales, fueron amablemente proporcionados por el Dr. Marcelo Kogan (Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile). Las capturas fotográficas se realizaron utilizando una cámara Nikon DS-Fi2 (Nikon, Tokio, Japón).

6.11. Detección de la expresión de GlyR α 1 $_{wt}$ y GlyR α 1 $_{mut}$ mediante RT-PCR.

Luego de 96 horas post-transfección con pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine o pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{mut}$ -mCitrine, se purificó el RNA total de los cultivos celulares. Para ello, se retiró el medio de cultivo y las células transfectadas se homogeneizaron en 500 μ l del reactivo TRIzol por pocillo (2 cm de diámetro) y se traspasaron a un microtubo de 1,5 ml. La mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se aplicó 5 pulsos de sonicación en baño ultrasónico (Cleaner 3lt., ISOLAB Laborgeräte GmbH, Wertheim, Alemania). Después, se agregó 200 μ l de cloroformo, se agitó fuertemente a mano durante 15 segundos y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 12.000 x g durante 15 minutos a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a otro microtubo y se agregó 500 μ l de isopropanol, se mezcló por inversión e incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 12.000 x g durante 10 minutos a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. Luego, se lavó el precipitado con 1 ml de etanol al 75%, re suspendiéndolo mediante vortex y se centrifugó a 7500 x g durante 5 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se secó el RNA precipitado mediante vacío durante 10 minutos. El RNA obtenido se disolvió en 50 μ l de agua libre de nucleasas y se

cuantificó mediante espectrofotometría a 260 nm (Epoch, Biotek Instruments, USA). La integridad del RNA se confirmó mediante la visualización en gel de agarosa al 0,8 % de las bandas de los RNAs ribosomales de 18S y 28S.

Para eliminar una posible contaminación con DNA, el RNA obtenido se trató con DNAsa I. Para ello se trató 1 µg de RNA con 1 U de DNAsaI en 10 µl de Tris-HCl 20 mM (pH 8.4), MgCl₂ 20 mM, KCl 50 mM (tampón comercial 10X, Invitrogen). La mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para inactivar la enzima DNAsa I, se agregó 1 µl de EDTA 25 mM a la mezcla de reacción y se incubó durante 10 minutos a 65 °C.

Los RNAs mensajeros (mRNAs) para GlyRα1 y β-actina, se detectaron mediante reacciones de transcripción inversa (RT), seguidas por una reacción de polimerización en cadena (PCR) convencional. Para la reacción de RT se mezclaron 1 µg de RNA con el *Máster mix* 1x del kit *High-capacity cDNA Reverse Transcription* (tampón RT 1X, dNTP 4 µM, partidores aleatorios RT 1X, 2,5 U de Transcriptasa Inversa MultiScribe®, 1 U de inhibidor de RNAsa) (Applied biosystems, Waltham, MA, USA) en un volumen de 20 µl. La mezcla se incubó en termociclador de acuerdo con el programa de temperatura indicado en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Programa de temperatura de las reacciones de transcripción inversa.

	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Etapa 4
Temperatura	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Tiempo	10 minutos	120 minutos	5 minutos	∞

Para las reacciones de PCR convencional, se mezclaron 5 µl de reacción de RT, 0,625 U de DNA pol *Taq*, 0,2 µM de cada partidor (MR-52 y MR-56 para GlyRα1; TG-180 y TG-181 para β-actina), 200 µM de cada dNTP y Tris-HCl 20 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, KCl 10 mM. MgSO₄ 2 mM, Triton® X-100 0,1% (tampón comercial 10X, New England Biolabs) en un volumen de 25 µl. La mezcla se incubó en termociclador de acuerdo con el programa de temperatura indicado en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Programa de temperatura de las reacciones de PCR convencional.

Etapa	Denaturación inicial	30 ciclos			Extensión final	Mantención
		Denaturación	Apareamiento	Extensión		
Temperatura	95 °C	95 °C	58 °C	72 °C	72 °C	4 °C
Tiempo	30 segundos	15 segundos	30 segundos	1 minuto	5 minutos	∞

Los amplicones obtenidos (705 pb para GlyR α 1 y 350 pb para β -actina) se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,1% y 1,5%.

6.12. Detección de las mutaciones AA1524/1525GC y AA1527/1528GC en el amplicón generado a partir del cDNA de GlyR α 1mut.

Para detectar la presencia de las mutaciones AA1524/1525GC y AA1527/1528GC en el amplicón generado a partir del cDNA de GlyR α 1mut se realizó un análisis de restricción con la enzima SacII. Para ello, se incubó 3 μ l de amplicón del de GlyR α 1mut con 20 U de SacII a 37 °C en 32 μ l de Tris-HCl 10 mM (pH 7.5), MgCl₂ 10 mM, BSA 0,1 mg/ml, durante 16 horas. Como control, se digirió 3 μ l de amplicón del de GlyR α 1wt en las mismas condiciones. Los productos de digestión obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, incubados con GelRed® 1X y exposición a luz UV.

6.13. Cell sorting.

Para aumentar el porcentaje de células efectivamente transfectadas, se seleccionaron las células positivas para el reportero mCitrina mediante citometría de flujo en el laboratorio FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*) del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Después de 96 horas post-transfección, se preparó los cultivos según los requerimientos de la citometría de flujo. Para ello, se retiró el medio de cultivo de pocillos de 2 cm de diámetro, se agregó 200 μ l de PBS 1X, EDTA 5mM estéril y se despegó mecánicamente las células. Luego, se agregó 800 μ l de PBS 1X, EDTA 5mM estéril y se re-suspendió el cultivo celular. La suspensión celular se traspasó a un tubo de centrifuga estéril y se centrifugó a 1500 x g a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después se retiró el sobrenadante, se re-suspendió el precipitado (aproximadamente 10 millones de células) en 1 ml de PBS 1X, EDTA 5 mM, suero fetal de

bovino 10% y se traspasó a un tubo de citometría de 5 ml Falcon® (Corning Incorporated). Para seleccionar las células activadas por fluorescencia, se usó un equipo de citometría de flujo FACSAriaIII. Para el análisis de las muestras purificadas, se usó el *software* FACSDiva version 6.1.3.

6.14. Estudio de la expresión GlyR α 1wt y GlyR α 1mut mediante inmunocitoquímica.

Las células co-transfectadas y seleccionadas mediante citometría de flujo, se sembraron en una placa de cultivo estéril de 35 mm de diámetro con 2 ml de medio de cultivo completo que contenía en su interior un cubreobjetos de 25 mm de diámetro previamente tratado con poli-L-lisina 0,01%. La placa se incubó a 37°C y CO₂ 5% durante toda la noche. Luego se procedió a la fijación celular. Para ello, se retiró el medio de cultivo, se lavó la placa con 2 ml de TBS 1 X (Tris-base 25 mM, NaCl 137 mM, KCl 2 mM, pH 7,4) durante 5 minutos por 2 veces. Después, se agregó 1,5 ml de paraformaldehído 4% pH 7,2 y se incubó a temperatura ambiente durante 18 minutos. Luego, se lavó la placa con 2 ml de TBS 1 X durante 5 minutos por 3 veces.

En un ambiente húmedo y oscuro se agregó 125 μ l de solución de bloqueo [suero normal de cabra (NGS) al 6,25%, BSA al 3%, tritón X-100 al 0,1% en TBS 1X] y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se lavó la placa con 300 μ l de TBS 1 X durante 5 minutos por 3 veces. Luego se agregó 150 μ l de una dilución 1:100 de anticuerpo monoclonal anti GlyR α 1 de ratón (diluido en solución de bloqueo), y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después se lavó la placa con 300 μ l de TBS 1 X durante 5 minutos por 3 veces. Posteriormente, se agregó 150 μ l de una dilución 1:400 de anticuerpo policlonal anti-ratón con DAPI 1:5000 (diluido en TBS 1X), y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego se lavó la placa con 300 μ l de TBS 1 X durante 5 minutos por 3 veces. Finalmente, se montó la inmunocitoquímica, para ello se colocó el cubreobjeto con las células adheridas sobre un par de gotas de medio de montaje de Mowiol (glicerol 3 M, Mowiol 4 mM 31.000 g/mol, 1,4-diazobicyclo-[2.2.2]-octane (DABCO) 2,5%, Tris 0,12 M, pH 8,5) en un portaobjetos, se dejó secar a temperatura ambiente y sin humedad, y se almacenó las muestras a 4 °C en oscuridad.

La detección de la inmunocitoquímica, se realizó mediante un Microscopio confocal Zeiss modelo LSM 700 (Oberkochen, Alemania), utilizando el software ZEN 2012 versión

8.0.0.273, perteneciente al servicio de microscopía confocal del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

6.15. Estudios de funcionalidad GlyR α 1 mediante electrofisiología.

Los ensayos de electrofisiología (*patch clamp* en configuración *whole cell*), fueron desarrollados en el Laboratorio de Neurofisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Las células fueron co-transfectadas usando 0,87 μ g de pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine o pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{mut}$ -mCitrine con 0,13 μ g de plásmido pCre-GFP. Después de 48 horas de la co-transfección, las células fueron visualizadas en microscopio invertido Nikon eclipse TE2000-S (Minato, Tokyo, Japón), para la identificación y selección de células fluorescentes, a las que se posteriormente les realizó un registro electrofisiológico.

Las pipetas de *patch clamp* se prepararon a partir capilares de borosilicato (World Precision Instruments, Sarasota, FL, EE. UU.) usando un pulidor de micropipeta P-87 (Sutter Instruments, Novato, CA, USA). La resistencia de las micropipetas fue de 4 a 8 M Ω . La pipeta de *patch clamp* fue manipulada con el micromanipulador EXFO Burleigh PCS-6000 (Thorlabs Inc., Newton, NJ, EE. UU.). La solución interna, usada para emular el contenido iónico intracelular, contenía KCl 120 mM, MgCl₂ 4 mM, BAPTA 10 mM, Na₂-GTP 0,5 mM y Na₂-ATP 2 mM, (pH 7.4, 290-310 mOsm). La solución externa normal (SEN) contenía NaCl 150 mM, KCl 5,4 mM, CaCl₂ 2,0 mM, MgCl₂ 1.0 mM, glucosa 10 mM y HEPES 10 mM, (pH 7.4, 315-320 mOsm). En el sistema de perfusión extracelular se colocaron la solución de lavado (SEN), la solución de glicina 1 mM, y en el caso de la co-transfección con pAAV-DIO-mCitrine, además, se utilizó SEN diluida y H₂O destilada como controles positivos de la técnica. Los registros electrofisiológicos de configuración *whole cell* se realizaron mediante el amplificador de microelectrodo Axon Axopatch 200B (Molecular Devices, San Jose, CA, EE. UU.), a un potencial constante de -30 mV.

7. RESULTADOS

7.1. Detección de la expresión del reportero mCitrina en experimentos de transfección de células Cre positivas con el plásmido de transferencia pAAV-DIO-GlyR-mCitrine.

Como material inicial para el desarrollo de esta tesis se recibió el plásmido pAAV-DIO-GlyR-mCitrine que teóricamente codificaba el cDNA de la subunidad $\alpha 1$ del receptor de glicina humano (GlyR $\alpha 1$) flanqueado por secuencias *loxP*. Los estudios iniciales en este objetivo se orientaron a caracterizar la identidad de este material mediante su secuenciación y luego estudiar su capacidad de expresar el transgén en células en cultivo que expresaran la recombinasa Cre, necesaria para la funcionalidad de los sitios *loxP*. En este último punto, se optimizó el tipo de línea celular a utilizar, los métodos de expresión de la recombinasa Cre y el tipo de agente transfectante utilizado.

7.1.1. Validación del plásmido pAAV-DIO-GlyR-mCitrine.

La estructura teórica del plásmido pAAV-DIO-GlyR-mCitrine se muestra en la **Figura 8A**. En ella se observa que este plásmido de 7495 pb contiene un casete de expresión (7090 – 3871 pb) constituido por el promotor de la sinapsina humana (484 pb), el cDNA invertido de GlyR $\alpha 1$ (1349 pb) y el cDNA invertido del reportero fluorescente mCitrina (716 pb), ambos cDNAs flanqueados por sitios *loxP* en orientación opuesta. Para confirmar esta estructura, el plásmido fue secuenciado usando 6 partidores que permitieron secuenciar en ambas hebras del DNA plasmidial, la región comprendida entre las posiciones 3300 pb a 5900 pb del plásmido (**Figura 8B**). Los resultados de la secuenciación mostraron que la secuencia nucleotídica del receptor de glicina (GlyR) inserto en el plásmido pAAV-DIO-GlyR-mCitrine (desde ahora llamado pAAV-DIO-GlyR $\alpha 1$ *wt*-mCitrine) posee una identidad de 100% con el cDNA de la variante transcripcional 2 del gen de la subunidad alfa 1 del receptor de glicina de *Homo sapiens* (NCBI Reference Sequence NM_000171.3).

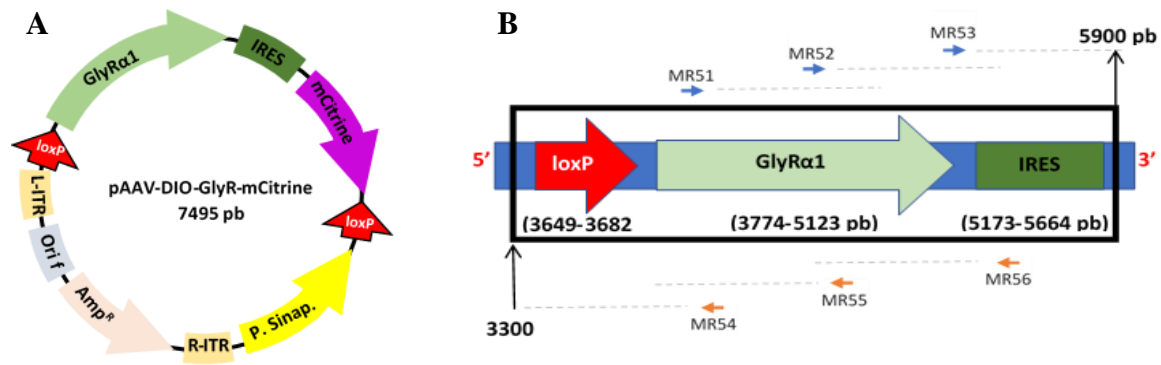


Figura 8. Caracterización del plásmido pAAV-DIO-GlyR α 1wt-mCitrine. **A:** Esquema de la estructura del plásmido pAAV-DIO-GlyR α 1wt-mCitrine. R-ITR y L-ITR = repetición terminal invertida derecha e izquierda, respectivamente (del inglés inverted terminal repeat), IRES = sitio interno de entrada del ribosoma (del inglés internal ribosome entry site), Ori f = Origen de replicación derivado del plásmido f, Amp^R = gen de resistencia a ampicilina. **B:** Esquema de la región secuenciada del plásmido pAAV-DIO-GlyR α 1wt-mCitrine. Con flechas azules se indica a los partidores forward, con flechas rojas se indica a los partidores reverse. Cada partididor permite secuenciar entre 600-800 pb en calidad adecuada. En la caja negra se indica la región a secuenciar que abarca aproximadamente de la posición 3300 pb. a 5900 pb.

7.1.2. Caracterización del plásmido pLV-Cre.

Debido a que las líneas celulares no expresan normalmente la recombinasa Cre, se adquirió el plásmido comercial pLV-Cre, que codifica Cre acoplada a una secuencia de señalización nuclear (NLS) (1593 - 2645 pb). En cultivo bacteriano el plásmido pLV-Cre genera un bajo número de copias (addgene *plasmid* #12106). El mapa de pLV-Cre se muestra en la **Figura 9A**.

El plásmido pLV-Cre se amplificó en células *E. coli* DH5 α , se purificó mediante lisis alcalina y se verificó su identidad mediante análisis de restricción con las enzimas BamHI, EcoRV y XmaI. El análisis de restricción de pLV-Cre mediante el software Serial Cloner predice que la digestión con BamHI genera 2 fragmentos de 7858 y 1162 pb; EcoRV 3 fragmentos de 8200, 739 y 79 pb; y XmaI 2 fragmentos de 8822 y 196 pb. Los resultados de la electroforesis del plásmido pLV-Cre digerido con las enzimas BamHI, EcoRV y XmaI confirman los tamaños teóricos de los fragmentos generados (**Figura 9B**) confirmando la identidad del plásmido pLV-Cre.

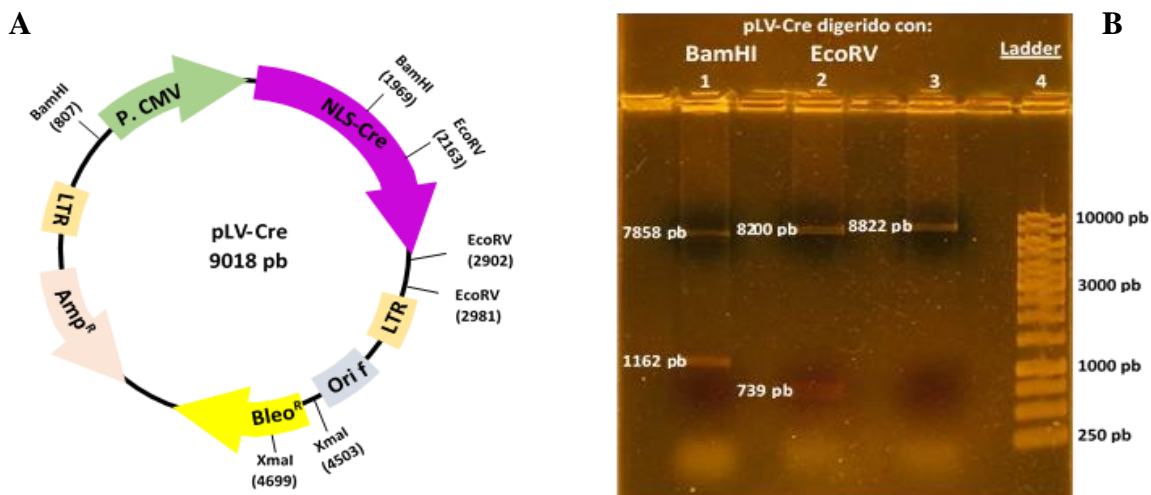


Figura 9. Caracterización del plásmido pLV-Cre. **A:** Esquema de la estructura del plásmido pLV-Cre. LTR = repetición terminal larga (del inglés *long terminal repeats*), Bleo^R = gen de resistencia a bleomicina, P. CMV = promotor de Citomegalovirus. **B:** Electroforesis en gel agarosa 0,8% de plásmido pLV-Cre digerido con enzimas de restricción. De izq. a der.: carril 1, pLV-Cre/BamHI; carril 2, pLV-Cre/EcoRV; carril 3, pLV-Cre/XmaI; carril 4, O'generuler 1kb DNA Ladder. Condiciones electroforesis: 100V por 60 min, revelado en GelRed 1X. Los tamaños en pares de bases, correspondientes a las bandas digeridas (se indican en blanco en el gel), representan los valores teóricos de éstas, calculados por el *software* Serial Cloner.

7.1.3. Purificación plásmido pLV-Cre en calidad para transfección.

Para purificar el plásmido pLV-Cre en una calidad adecuada para transfectar líneas celulares, se purificó el plásmido mediante kit de extracción por columna (kit E.Z.N.A. Midikit Endofree) libre de endotoxinas. Para evaluar la concentración del plásmido pLV-Cre se midió su concentración mediante absorbancia a 260 nm, lo que arrojó un valor de 18,9 ng/μl. Esta concentración fue muy baja para el uso en transfección, esperándose valores superiores a 50 ng/μl.

Para mejorar el rendimiento de la purificación se utilizó el **método de Begbie**, protocolo de amplificación de plásmidos de bajo número de copias que utiliza cloranfenicol 3 μg/ml para inhibir la síntesis proteica en la bacteria y favorecer la replicación del plásmido. Los resultados con este método no fueron satisfactorios, incluso menores que la extracción por columna.

Después se estudió el uso del **método de Maniatis**, protocolo de ampliación de plásmidos de bajo número de copias que utiliza cloranfenicol 170 µg/ml, sin resultados favorables.

En vista de los resultados, se decidió purificar el plásmido pLV-Cre mediante el método de lisis alcalina a partir de un gran volumen de cultivo, seguida de tratamiento con RNAsa y posterior extracción con fenol/cloroforno. La determinación de la concentración del plásmido pLV-Cre purificado de esta forma fue de 244,15 ng/µl, suficiente para proceder a la transfección de células eucariontes en cultivo.

7.1.4. Co-transfección de células HEK-293.

Se co-transfectó células HEK-293 con los plásmidos pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine y pLV-Cre, como controles positivos de transfección se usaron los plásmidos pAAV-GFP, pmCitrine-N1 y un control negativo sin plásmido (Mock), utilizando como agente transfectante polietilenimina. A las 48 horas postransfección, se observaron los cultivos en un microscopio de fluorescencia. Los resultados mostraron que no hubo expresión del reportero mCitrina al co-transfectar pLV-Cre con pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine en células HEK-293. Los controles positivos mostraron fluorescencia verde atribuible a la expresión de las proteínas reporteras (**Figura 10**). Es posible que estos resultados negativos se deban a dos factores: i) una baja expresión de la proteína Cre, la que es necesaria para la expresión de pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine o, ii) una baja actividad del promotor de sinapsina I en células HEK-293 que ocasionaría una baja expresión de los genes GlyR α 1 $_{wt}$ y mCitrine, dependiente de este promotor.

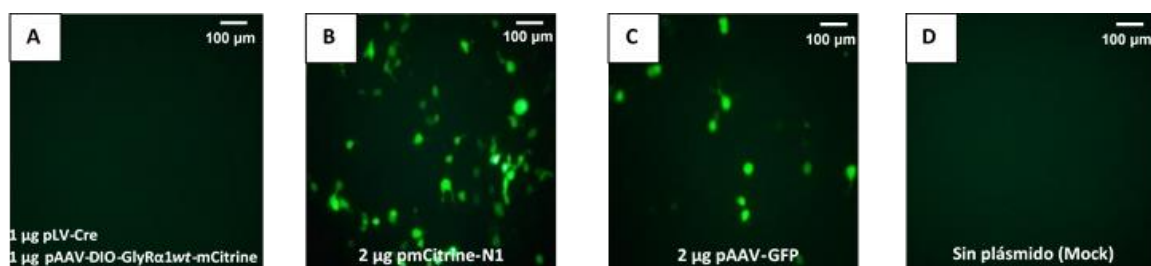


Figura 10. Fotomicrografías de fluorescencia de células HEK-293 transfectadas. A: Fotografía de células HEK-293, 48 horas después de ser co-transfectadas con 1 µg de pLV-Cre y 1 µg de pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine. Como controles se transfectó con: B: 2 µg pmCitrine-N1, C: 2 µg pAAV-GFP y D: sin plásmido (Mock). Agente de transfección: polietilenimina. Se usó un microscopio Olympus CKX41 excitando con filtro de fluorescencia *B-excitation* (460-490 nm).

7.1.5. Transfección de células PC-12.

Debido a que no se detectó expresión del reportero mCitrina al co-transfectar células HEK-293, tampoco se esperó expresión de GlyR α 1. Por lo tanto, se estudió el uso de células de feocromocitoma de rata (PC-12) que debido a su origen neuronal presentan una elevada actividad del promotor de sinapsina I (Thiel y cols., 1991), que también comanda la expresión de GlyR α 1 en pAAV-DIO-GlyR α 1 wt -mCitrine. Además, las células PC-12 no expresan constitutivamente GlyR α 1 (Heck y cols., 1997), lo que las hace un buen modelo para realizar estos estudios de expresión. Para ello, se transfectó células PC-12 con diferentes proporciones de los plásmidos pAAV-DIO-GlyR α 1 wt -mCitrine y pLV-Cre. Como control positivo se transfectaron células PC-12 con pmCitrine-N1.

Los resultados mostraron que 96 hrs. después de co-transfectar 0,5 μ g de pAAV-DIO-GlyR α 1 wt -mCitrine con 1,5 μ g de pLV-Cre, se detectó la expresión de mCitrina en células PC-12 (**Figura 11**). No se detectó la expresión de mCitrina al utilizar otras proporciones de los plásmidos (1:1; 1,5:0,5). El control positivo pmCitrina-N1 también mostró expresión de mCitrina con un porcentaje de transfección cercano al 20%.

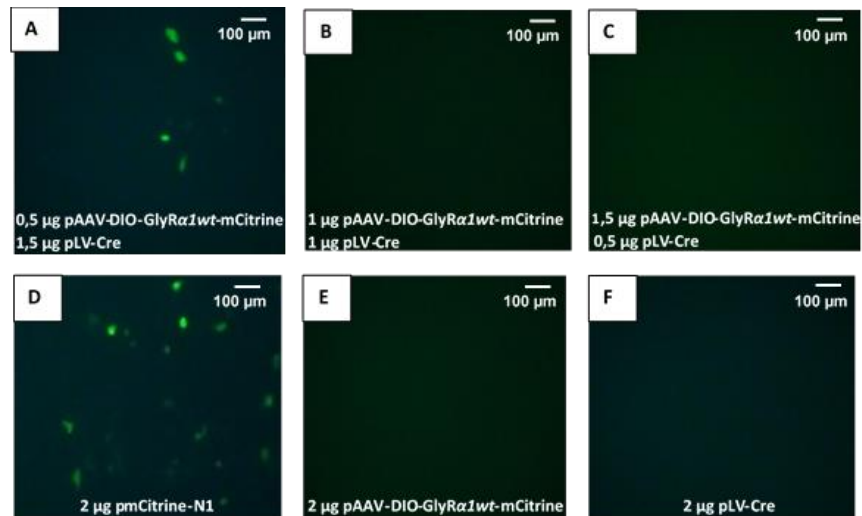


Figura 11. Fotomicrografías de fluorescencia de células PC-12 transfectadas con pAAV-DIO-GlyR α 1 wt -mCitrine y pLV-Cre. A: Fotografía de células PC-12, 96 hrs. después de ser co-transfectadas con pAAV-DIO-GlyR α 1 wt -mCitrine pLV-Cre en proporción 0,5:1,5 μ g; **B:** 1:1 μ g; y **C:** 1,5:0,5 μ g respectivamente. **D:** Control, 2 μ g de pmCitrine-N1, **E:** 2 μ g pAAV-DIO-GlyR α 1 wt -mCitrine y **F:** 2 μ g pLV-Cre. Se usó el microscopio Olympus CKX41, excitando con filtro de fluorescencia *B-excitation* (460-490 nm).

Si bien, se detectó la expresión del reportero mCitrina al co-transfectar pAAV-DIO-GlyR-mCitrine y pLV-Cre, los niveles de transfección estimados fueron muy bajos (< 0.5%), lo que hacían difícil la detección de GlyR α 1 mediante *western blot*. Estos bajos niveles de expresión se podían atribuir a: i) el elevado tamaño de pLV-Cre (9 kb) que podía reducir la eficiencia de la co-transfección y ii) a la imposibilidad de purificar pLV-Cre mediante un método que asegurara su calidad óptima para la transfección de células en cultivo, debido principalmente al bajo número de copias que este vector generaba en cultivos bacterianos.

Para superar estas limitaciones, se decidió sub-clonar la secuencia NLS-Cre (presente en pLV-Cre) en el vector pAAV-MCS. El vector pAAV-MCS presentaba las siguientes ventajas: i) un tamaño de 4650 pb, mucho menor a pLV-Cre, lo que podía incidir en una mejor eficiencia de transfección, y ii) la factibilidad de ser purificado en calidad adecuada para transfección (datos previos del laboratorio).

7.1.6. Generación plásmido pAAV-Cre.

Para generar el plásmido pAAV-Cre se escindió la secuencia NLS-Cre mediante la digestión del plásmido LV-Cre con las enzimas de restricción EcoRI y Sall y la posterior ligación de este fragmento en el plásmido pAAV-MCS (vector) digerido previamente con estas mismas enzimas (**Figura 12**). El plásmido resultante pAAV-Cre se amplificó en células *E. coli* DH5 α , se purificó mediante lisis alcalina y se verificó su identidad mediante análisis de restricción con las enzimas BamHI, PstI y SacI. El análisis de restricción de pAAV-Cre mediante el software Serial Cloner predice que la digestión con BamHI genera 1 fragmento de 5735 pb; con PstI 3 fragmentos de 2605, 2456 y 692 pb; y con SacI 1 fragmento de 5735 pb. Los resultados de la electroforesis del plásmido pAAV-Cre digerido con las enzimas BamHI, PstI y SacI confirman los tamaños teóricos de los fragmentos generados (**Figura 13**) confirmando la identidad del plásmido pAAV-Cre.

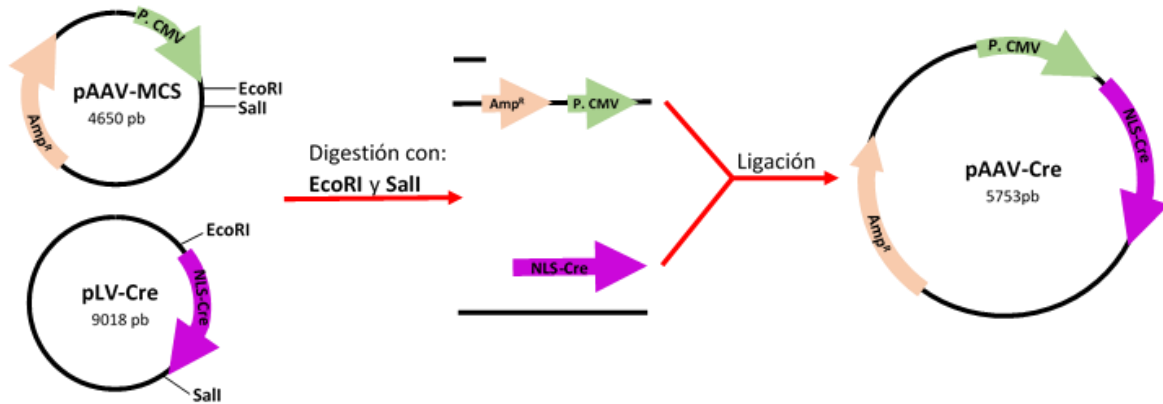


Figura 12. Esquema de generación de plásmido pAAV-Cre. Los plásmidos pLV-Cre y pAAV-MCS se digirieron con EcoRI y Sall. Posteriormente se ligaron, y se utilizó el producto de ligación para amplificar en *E. coli* DH5 α , y finalmente, seleccionar los plásmidos correctamente ligados.

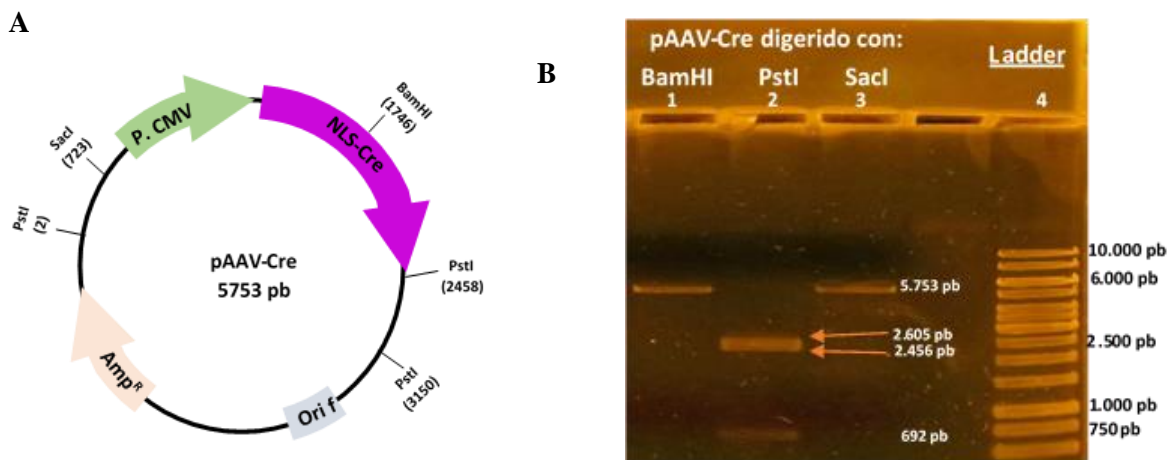


Figura 13. Caracterización del plásmido pAAV-Cre. **A)** Esquema de la estructura del plásmido pAAV-Cre. **B)** Electroforesis en gel agarosa 0,8% del plásmido pAAV-Cre digerido con las enzimas de restricción BamHI, PstI y SacI. Carril 1: pAAV-Cre/BamHI; Carril 2: pAAV-Cre/PstI; Carril 3: pAAV-Cre/SacI; Carril 4: 1kb DNA Ladder. En el caso de la digestión de pAAV-Cre con PstI los fragmentos de 2605 y 2456 no se observan como bandas separadas debido a su tamaño similar. Condiciones electroforesis: 100V por 60 min, revelado en GelRed 1X. Los tamaños en pares de bases, correspondientes a las bandas digeridas (se indican en blanco en el gel), representan los valores teóricos de éstas, calculados por el *software* Serial Cloner. No fue posible distinguir la presencia del doblete de segmentos digeridos por PstI, sólo se indica sus tamaños hipotéticos, de 2605 pb. y 2456 bp.

7.1.7. Co-transfección de células PC-12 con pAAV-DIO-GlyR α 1wt-mCitrine y pAAV-Cre.

Se co-transfectó células PC-12 con los plásmidos pAAV-DIO-GlyR α 1wt-mCitrine y pAAV-Cre usando como agente transfectante se usó polietilenimina. Como control positivo de transfección se usó el plásmido pmCitrine-N1. A las 96 horas se observaron los cultivos en un microscopio de fluorescencia. Los resultados mostraron que no hubo expresión del reportero mCitrina al co-transfectar pAAV-Cre con pAAV-DIO-GlyR α 1wt-mCitrine en células PC-12. El control positivo mostró fluorescencia verde atribuible a la expresión de la proteína reportera (**Figura 14**).

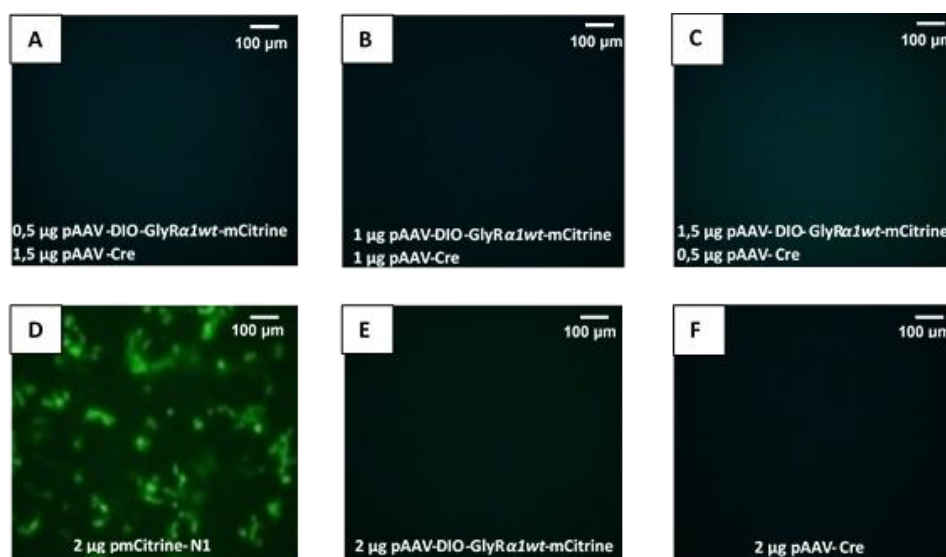


Figura 14. Fotomicrografías de fluorescencia de células PC-12 transfectadas con distintas proporciones de pAAV-DIO-GlyR α 1wt-mCitrine y pAAV-Cre. **A:** Fotografía de células PC-12, 96 horas después de ser co-transfectadas con pAAV-DIO-GlyR α 1wt-mCitrine pLV-Cre en proporción 0,5:1,5 μg; **B:** 1:1 μg; y **C:** 1,5-0,5 μg respectivamente. Como controles se transfectó con **D:** 2 μg de pmCitrine-N1, **E:** 2 μg pAAV-DIO-GlyR α 1wt-mCitrine y **F:** 2 μg pAAV-Cre.

Dado los resultados negativos del experimento anterior, se realizó un nuevo ensayo, pero usando esta vez Lipofectamina 2000 como agente de transfección. A las 96 horas postransfección, los resultados mostraron que hubo expresión del reportero mCitrina al co-transfectar pAAV-Cre con pAAV-DIO-GlyR α 1wt-mCitrine en distintas proporciones en las células PC-12. (**Figura 15**). Una optimización posterior de este experimento mostró que

la mayor expresión del reportero mCitrina se logró al co-transfectar 0,13 μg de pAAV-Cre con 0,87 μg de pAAV-DIO-GlyR α 1wt-mCitrine usando 6 μl de lipofectamina 2000.

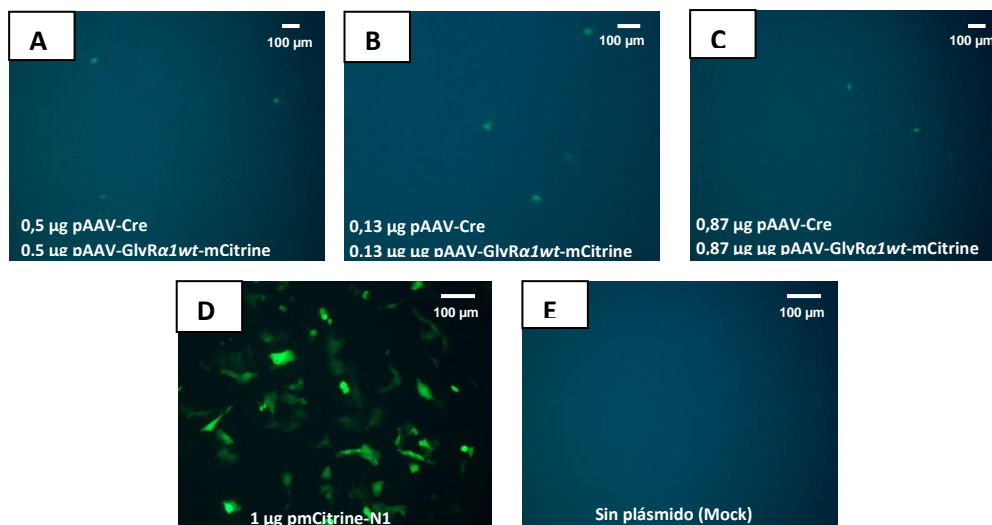


Figura 15. Fotomicrografías de fluorescencia de células PC-12 co-transfectadas usando lipofectamina 2000. **A:** Fotografía de células PC-12, 96 horas después de ser co-transfectadas con pAAV-DIO-GlyR α 1wt-mCitrine pAAV-Cre en proporción 0,5:0,5 μg ; **B:** 0,13:0,13 μg ; y **C:** 0,87:0,87 μg respectivamente. Controles, **D:** 1 μg de pmCitrine-N1, **E:** sin plásmido (Mock).

7.1.8. Co-transfección de células PC-12 con pAAV-DIO-GlyR α 1wt-mCitrine y pAAV-Cre mediante electroporación.

Debido a los bajos rendimientos obtenidos al co-transfectar células PC-12 mediante métodos químicos de transfección, se estudió la efectividad del método de electroporación, un método físico de transfección que ha demostrado generar una elevada eficiencia de transfección en células PC-12 (70-90%) (Covello y cols., 2014).

Para ello, se electroporó células PC-12 usando distintas proporciones de los plásmidos pAAV-DIO-GlyR α 1wt-mCitrine y pAAV-Cre. Como control positivo de electroporación, se usó el plásmido pmCitrine-N1. A las 96 horas se observaron los cultivos en un microscopio de fluorescencia. Los resultados mostraron que no hubo expresión del reportero mCitrina al electroprar pAAV-DIO-GlyR α 1wt-mCitrine con pAAV-Cre en células PC-12 en proporciones 7:1 μg (**Figura 16A**) y 4:4 μg (**Figura 16B**). Se detectó en una sola célula expresión de mCitrina al realizar 2 procedimientos de electroporación sucesivas (un plásmido a la vez) (**Figura 16C**), lo que da cuenta de una eficiencia de transfección mucho

menor a la obtenida con los métodos químicos ensayados anteriormente en esta tesis. El control positivo pmCitrine-N1 mostró fluorescencia verde atribuible a la expresión de la proteína reportera con una eficiencia de transfección de alrededor de un 80% (**Figura 16D**).

Debido a que con la electroporación no se logró aumentar los rendimientos en la co-transfección de células PC-12, para posteriores ensayos de detección de GlyR α 1, tales como de inmunocitoquímica, se optó por utilizar el método de transfección con lipofectamina 2000, debido a que mostró la mayor eficiencia de transfección entre los métodos de transfección ensayados.

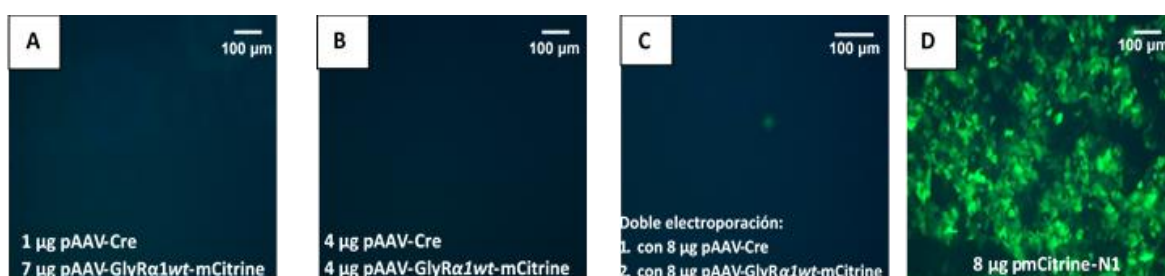


Figura 16. Fotomicrografías de fluorescencia de células PC-12 electroporadas con distintas proporciones de pAAV-DIO-GlyR α 1wt-mCitrine y pAAV-Cre. **A:** Fotografía de células PC-12, 96 horas después de ser electroporadas con pAAV-DIO-GlyR α 1wt-mCitrine y pAAV-Cre en proporción 7:1 μ g; **B:** 4:4 μ g; y **C:** 8:8 μ g (doble electroporación). Control, **D:** 8 μ g de pmCitrine-N1.

7.2. Introducción de cambios aminoacídicos KK385/386AA en el gen de la subunidad α 1 de GlyR mediante mutación sitio dirigida.

Estudios anteriores realizados en el laboratorio del Dr. Aguayo han mostrado que la potenciación de la actividad del receptor GlyR α 1 por etanol es bloqueada al introducir los cambios aminoacídicos **KK385/386AA** en la cadena polipeptídica de GlyR α 1 (Yévenes y cols., 2008). Uno de los objetivos de esta tesis es introducir cambios nucleotídicos en la secuencia de GlyR α 1 codificada en pAAV-DIO-GlyR α 1wt-mCitrine de forma de generar una secuencia mutada de GlyR α 1 que codifique para una proteína con los cambios KK385/386AA. En la **Figura 17** se puede observar que para lograr este cambio aminoacídico se deben incorporar las mutaciones AA1524/1525GC y AA1527/1528GC en el cDNA de la subunidad α 1 de GlyR del plásmido pAAV-DIO-GlyR α 1wt-mCitrine. Para ello se diseñó la correspondiente secuencia mutada de GlyR α 1, la que fue enviada a

Genscript (New Jersey, EE. UU.) para su síntesis y subsecuente clonación para generar el plásmido pAAV-DIO-GlyR α 1mut-mCitrine. En la **Figura 18** se puede observar el resultado de la secuenciación de pAAV-DIO-GlyR α 1mut-mCitrine en el que se muestra la exitosa incorporación de los cambios nucleotídicos AA1524/1525GC y AA1527/1528GC.

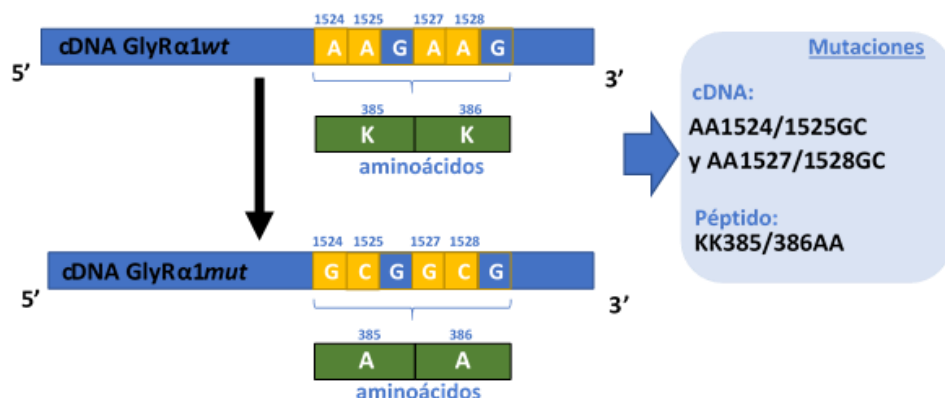


Figura 17. Esquema de cambios nucleotídicos en cDNA de GlyR α 1wt para generar GlyR α 1mut. Se generó los cambios nucleotídicos AA1524/1525GC y AA1527/1528GC en el cDNA de GlyR α 1wt del plásmido pAAV-DIO-GlyR α 1wt-mCitrine para generar pAAV-DIO-GlyR α 1mut-mCitrine.

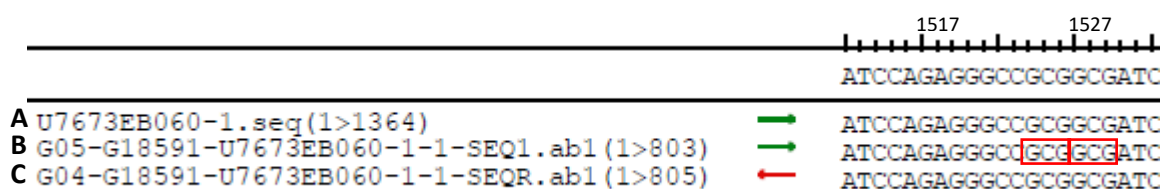


Figura 18. Imagen de la secuenciación del cDNA de GlyR α 1mut del plásmido pAAV-DIO-GlyR α 1mut-mCitrine. Los recuadros rojos muestran los codones que codifican los aminoácidos en las posiciones 385 y 386 de GlyR α 1, los que corresponden al del gen mutado (AA385/386). A y B: partidores forward, C: partidor reverse para la secuenciación de GlyR α 1mut.

7.3. Generación del plásmido control pAAV-DIO-mCitrine.

Dado que uno de los objetivos de esta tesis es generar vectores AAV que codifiquen GlyR α 1mut a partir del plásmido pAAV-DIO-GlyR α 1mut-mCitrine, para posteriores estudios *in vivo* con estos vectores, se requiere de un virus control que no codifique el cDNA de GlyR α 1mut pero que si codifique el reportero mCitrine. Para ello se generó el plásmido pAAV-DIO-mCitrine mediante la escisión de la secuencia codificante de GlyR α 1 desde pAAV-DIO- GlyR α 1wt-mCitrine.

En la **Figura 19** se muestra que para generar el plásmido pAAV-DIO-mCitrine se digirió pAAV-DIO-GlyR α 1wt-mCitrine con las enzimas NheI (genera extremo cohesivo) y Eco147I (genera extremo romo), liberando el cDNA de GlyR α 1. Luego se trató el producto de digestión con la enzima del fragmento largo (Klenow) de la polimerasa I, para hacer romo el extremo que es cohesivo. Para autocircularizar el plásmido sin GlyR α 1, se utilizó la enzima ligasa de DNA de fago T4. Se transformó *E. coli* DH5 α con el producto de ligación, se identificó un clon potencial de pAAV-DIO-mCitrine y se purificó mediante lisis alcalina.

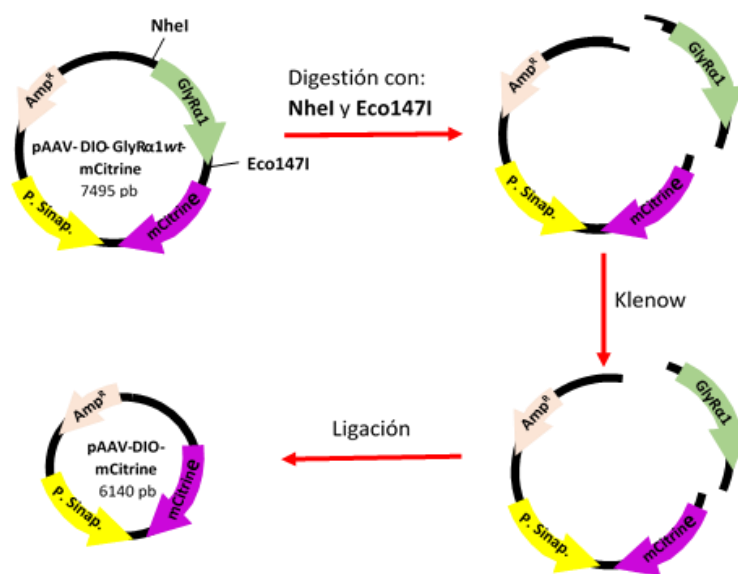


Figura 19. Esquema de generación de plásmido pAAV-DIO-mCitrine. El plásmido pAAV-DIO-GlyR α 1wt-mCitrine se digirió con *NheI* y *Eco147I*. Luego se trató los productos de digestión con la enzima del fragmento largo (Klenow) de la polimerasa I. Posteriormente se ligaron los productos de digestión, y se utilizó el producto de ligación para amplificar en *E. coli* DH5 α , y finalmente, seleccionar los plásmidos correctamente ligados.

La estructura del clon seleccionado se verificó mediante digestión con BamHI, HindIII y SacI y posterior electroforesis. El análisis de la secuencia de pAAV-DIO-mCitrine utilizando el programa Serial Cloner, indicó que BamHI corta el vector generando un fragmento de 6140 pb; HindIII genera 2 fragmentos de 5752 pb y 388 pb; mientras que SacI no presenta sitios en pAAV-DIO-mCitrine. Los patrones de digestión obtenidos a partir del clon seleccionado coinciden con los esperados, lo que confirmó la estructura del plásmido pAAV-DIO-mCitrine generado (**Figura 20A y 20B**).

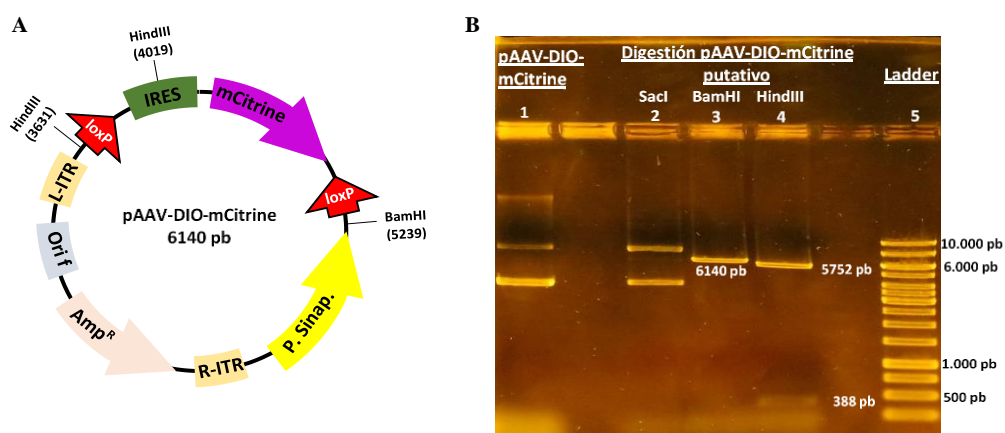


Figura 20. Caracterización del plásmido pAAV-DIO-mCitrine. **A.** Esquema de la estructura del plásmido pAAV-DIO-mCitrine. **B.** Electroforesis en agarosa 0,8% del plásmido pAAV-DIO-mCitrine digerido con SacI, BamHI y HindIII. Carril 1: pAAV-DIO-mCitrine; Carril 2: pAAV-DIO-mCitrine/SacI; Carril 3: pAAV-DIO-mCitrine/BamHI; Carril 4: pAAV-DIO-mCitrine/HindIII; Carril 5: 1kb DNA Ladder. Condiciones electroforesis: 100V por 60 min, revelado en GelRed 1X. Los tamaños en pares de bases, correspondientes a las bandas digeridas (se indican en blanco en el gel), representan los valores teóricos de éstas, calculados por el *software* Serial Cloner.

7.4. Determinar mediante RT-PCR, inmunocitoquímica y electrofisiología de la expresión de *GlyRa1wt* y *GlyRa1mut* en células Cre.

7.4.1. Estudio de la expresión *GlyRa1wt* y *GlyRa1mut* mediante RT-PCR.

Se co-transfectaron células PC-12 con las siguientes combinaciones de plásmidos: i) pAAV-DIO-*GlyRa1wt*-mCitrine/pAAV-Cre, ii) pAAV-DIO-*GlyRa1mut*-mCitrine/pAAV-Cre, y iii) pAAV-DIO-mCitrine/pAAV-Cre. Después de 96 horas, se purificó el RNA total y se retrotranscribió a cDNA usando partidores aleatorios. Posteriormente al cDNA total se usó como templado para reacciones de PCR convencional, destinadas a amplificar la región 4548-5252 correspondiente a la región *GlyRa1*-IRES-mCitrine (ver **Figura 8**) y la región

299-648 del cDNA de β -actina de rata. Los resultados mostraron que se detectó expresión de GlyR α 1 tanto para pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine como para pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{mut}$ -mCitrine (**Figura 21A**). No se detectó expresión de GlyR α 1 en las células transfectadas con el control pAAV-DIO-mCitrine. Para los tres co-transfecciones se detectó la expresión de β -actina. Estos resultados demuestran que los cDNAs de GlyR α 1 $_{wt}$ y GlyR α 1 $_{mut}$ se expresan en células PC-12 en contexto Cre. Adicionalmente, se pudo confirmar la presencia de la mutación AA1524/1525GC y AA1527/1528GC en el amplicón generado a partir del cDNA de GlyR α 1 $_{mut}$, ya que estos cambios nucleotídicos generan un sitio para la enzima de restricción SacII generando 2 fragmentos de 461 pb y 244 pb, que no se observan en el amplicón generado a partir del GlyR α 1 $_{wt}$. Los resultados mostrados en la **Figura 21B** confirman la presencia de la mutación AA1524/1525GC y AA1527/1528GC en el cDNA de GlyR α 1 generado por el plásmido pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{mut}$ -mCitrine.

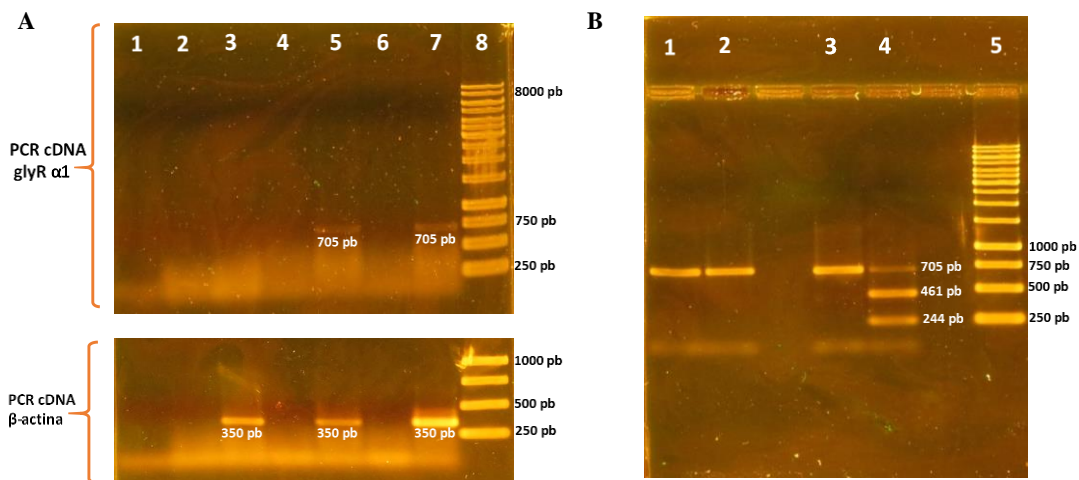


Figura 21. Fotografías de los productos de RT-PCR de células PC-12 co-transfectadas con pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine, pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{mut}$ -mCitrine y pAAV-DIO-mCitrine con pAAV-Cre. A. Arriba: electroforesis de los productos de RT-PCR usando partidores para cDNA de GlyR α 1, amplicón de 705 pb. Abajo: productos de RT-PCR usando partidores para cDNA de β -actina, amplicón de 350 pb. 1: blanco; 2: pAAV-DIO-mCitrine/pAAV-Cre s/RT; 3: pAAV-DIO-mCitrine/pAAV-Cre; 4: pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine/pAAV-Cre s/RT; 5: pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine/pAAV-Cre; 6: pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{mut}$ -mCitrine/pAAV-Cre s/RT; 7: pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{mut}$ -mCitrine/pAAV-Cre; 8: 1kb DNA Ladder. **B.** Electroforesis en agarosa 1,5% de productos de digestión de cDNA de GlyR α 1 (amplicón 705 pb) con SacII. 1: pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine/pAAV-Cre; 2: pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine/pAAV-Cre/SacII; 3: pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{mut}$ -mCitrine/pAAV-Cre; 4: pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{mut}$ -mCitrine/pAAV-Cre/ SacII; 5:

O'generuler 1kb DNA Ladder. Se observa una banda tenue de 705 pb, probablemente debido a contaminación con *glyRα1wt* en algún paso durante el proceso de amplificación por PCR.

7.4.2. Estudio de la expresión *GlyRα1wt* y *GlyRα1mut* mediante inmunocitoquímica.

Después de 96 hrs desde la co-transfección, las células que expresaban el reportero mCitrina fueron separadas selectivamente mediante cell-sorting para aumentar la probabilidad de encontrar células positivas para la expresión de *GlyRα1*. En la **Tabla 4** se indica la cantidad de células purificadas mCitrina positivas y la eficiencia de transfección respecto del número total de células. Los resultados mostraron que la eficiencia de co-transfección fue menor al 1% en todos los ensayos lo que justifica el uso de esta técnica para la selección de las células que efectivamente expresan *GlyRα1*.

Tabla 4. Cantidad y porcentaje de células PC-12 positivas para la expresión de mCitrina separadas por *cell sorter*.

Co-transfección	pAAV-DIO-GlyRα1wt-mCitrine	pAAV-DIO-GlyRα1mut-mCitrine	pAAV-DIO- mCitrine
Células purificadas	663	3180	1560
Eficiencia transfección	0,006%	0,032%	0,016%

Las células seleccionadas fueron posteriormente incubadas con un anticuerpo anti-GlyR alfa1 y un anticuerpo secundario conjugado a Cy3 1:400 más DAPI 1:5000. Las preparaciones se observaron en microscopio confocal y se registró fotografía. Los resultados en la **Figura 15** mostraron que hay detección de la proteína *GlyRα1* en las células PC-12 co-transfectadas con pAAV-DIO-GlyRα1wt-mCitrine/pAAV-Cre y pAAV-DIO-GlyRα1mut-mCitrine/pAAV-Cre. Se observó además ausencia de *GlyRα1* en las células PC-12 co-transfectadas con pAAV-DIO-mCitrine/pAAV-Cre al igual que las células PC-12 sin transfectar. Estos resultados muestran que las proteínas codificadas en los cDNAs de *GlyRα1wt* y *GlyRα1mut* se generan correctamente en células PC12 en contexto Cre.

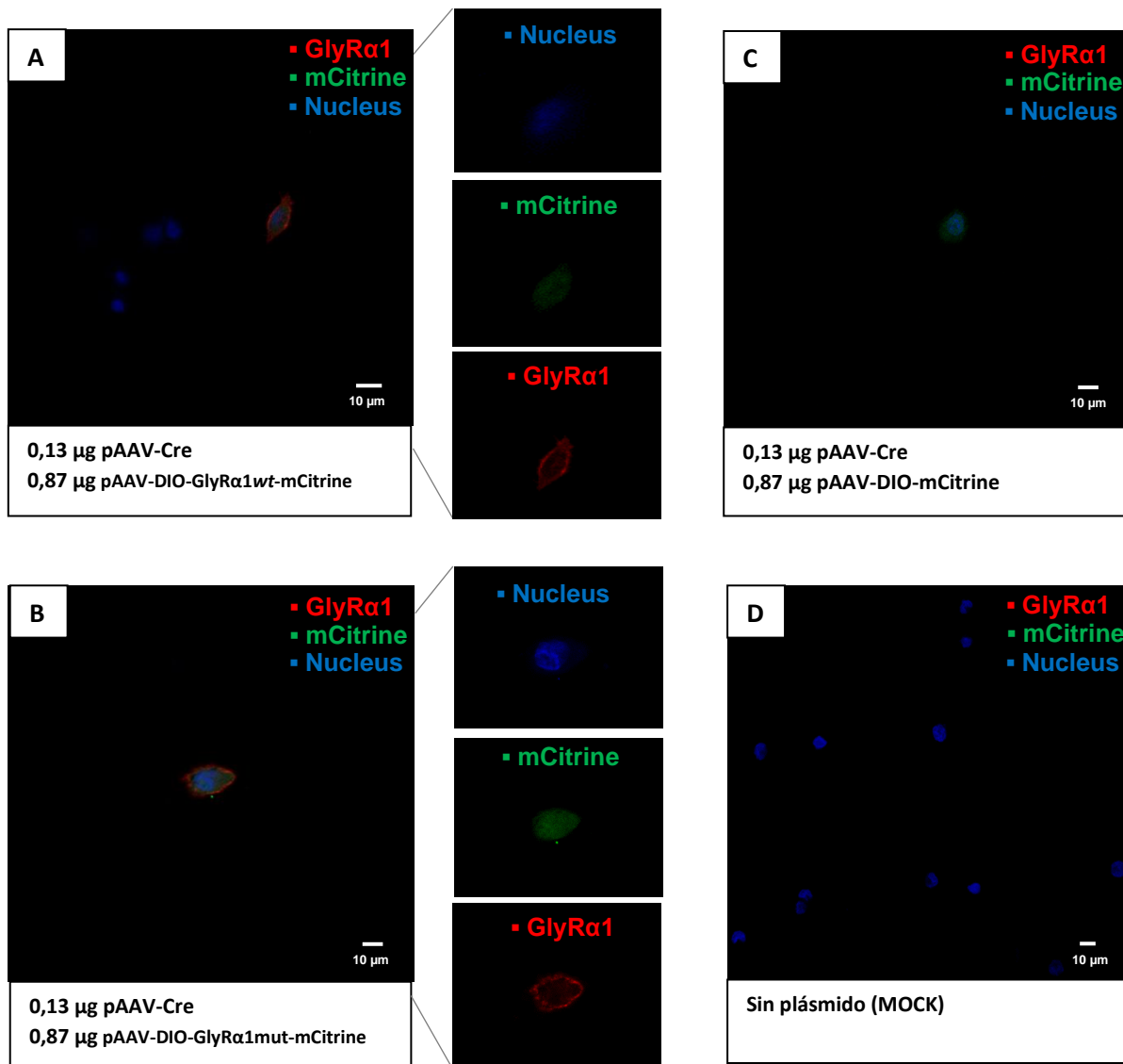


Figura 22. Fotomicrografías de los ensayos de inmunocitoquímica de células PC-12 co-transfectadas con plásmidos codificantes de *GlyRα1wt* y *GlyRα1mut*. **A.** pAAV-DIO-*GlyRα1wt*-mCitrine/pAAV-Cre **B.** pAAV-DIO-*GlyRα1mut*-mCitrine/pAAV-Cre **C.** pAAV-DIO-mCitrine/pAAV-Cre (control) y **D.** Sin plásmido. Azul: tinción DAPI, verde: fluorescencia en el espectro de citrina, rojo: fluorescencia en el espectro de Cy3. La imagen mostrada de la co-transfección corresponde a inmunocitoquímica usando anticuerpo 1° 1:100 y anticuerpo 2° 1:400.

7.4.3. Estudios de funcionalidad *GlyRα1wt* y *GlyRα1mut*.

Para estudiar la funcionalidad del canal iónico *GlyRα1* codificado en pAAV-DIO-*GlyRα1wt*-mCitrine y en pAAV-DIO-*GlyRα1mut*-mCitrine, se realizaron registros electrofisiológicos de patch clamp mediante la configuración de whole cell de células PC-

12 co-transfectadas con pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine/pCre-GFP y pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{mut}$ -mCitrine/pCre-GFP. Como control se usaron células PC-12 co-transfectadas con el plásmido control pAAV-DIO-mCitrine/pCre-GFP. Los resultados mostraron que al estimular localmente una célula PC-12 con 1 mM glicina, se observó una corriente iónica tanto en cultivos co-transfectados con pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine/pCre-GFP como en cultivos con pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{mut}$ -mCitrine/pCre-GFP (**Figura 23A y 23B**), mientras que en los controles co-transfectados con pAAV-DIO-mCitrine/pCre-GFP no se generó ninguna corriente (**Figura 23C**). La perfusión de agua si resultó en una corriente como era esperado, demostrando que el sistema de detección funcionaba correctamente. En conclusión, tanto el receptor GlyR α 1 $_{wt}$ (codificado en pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine) como GlyR α 1 $_{mut}$ (codificado en pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{mut}$ -mCitrine), generan un canal iónico funcional en células PC-12.

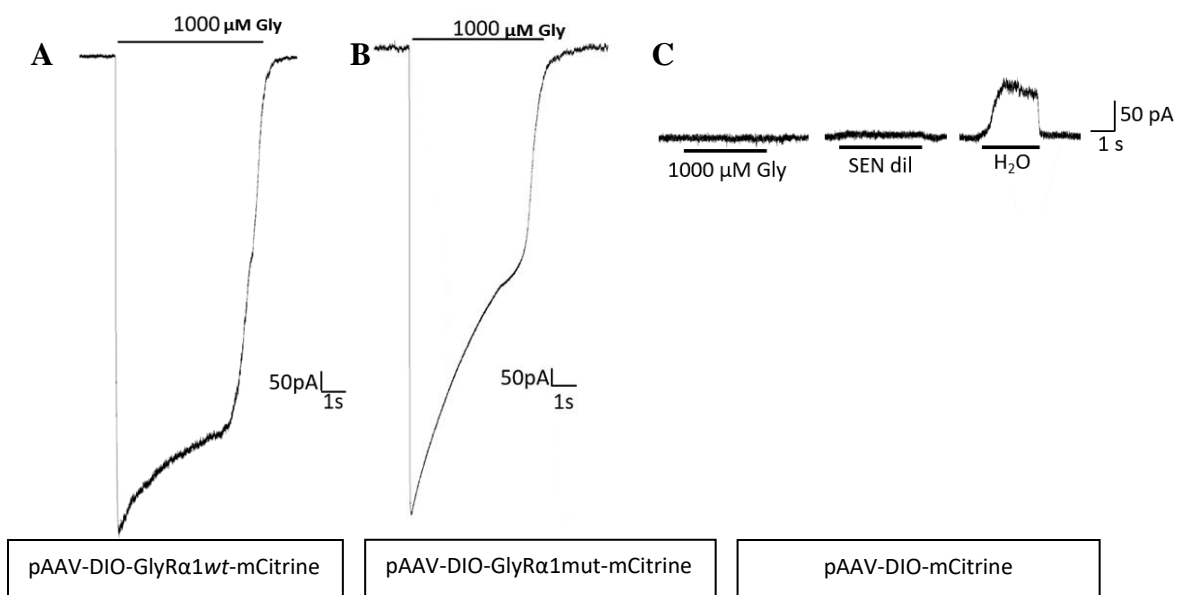


Figura 23. Corriente evocada por glicina de GlyR α 1 $_{wt}$. **A.** Imagen representativa de medición electrofisiológica de células PC-12 co-transfectada con 0.25 μ g de pCre-GFP y 1.75 μ g de pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine, al evocar con 1 mM de glicina. **B.** Imagen representativa de medición electrofisiológica de células PC-12 co-transfectada con 0,13 μ g de pCre-GFP y 0,87 μ g de pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{mut}$ -mCitrine, al evocar con 1 mM de glicina. **C.** imagen representativa de medición electrofisiológica de células PC-12 co-transfectada con 0.25 μ g de pCre-GFP y 1.75 μ g de plásmido control pAAV-DIO-mCitrine, al evocar con 1 mM de glicina, Solución Externa Normal (SEN) diluida y H₂O.

8. DISCUSIÓN

Estudios *in vitro* han mostrado que la potenciación por etanol del receptor de glicina del tipo alfa 1 (GlyR α 1) es bloqueada al introducir los cambios aminoacídicos KK385/386AA en la cadena polipeptídica de este receptor (Yévenes y cols., 2008). Además, estudios recientes realizados por el mismo grupo de investigación han mostrado que ratones knock-in (KI) del receptor GlyR α 1 con las mutaciones KK385/386AA son más tolerantes a los efectos sedativos del alcohol, mostrando un mayor consumo de alcohol y un aumento de la preferencia de lugar inducida por alcohol comparado con ratones silvestres (Muñoz y cols., 2019). No obstante, aún queda por dilucidar qué región cerebral es mayormente afectada por la expresión de este receptor GlyR α 1 mutado, ya que los ratones KI expresan esta versión mutada de GlyR α 1 en todo el sistema nervioso central.

En el laboratorio del Dr. Aguayo en la Universidad de Concepción, se dispone de ratones transgénicos que expresan la recombinasa Cre de forma predominante en neuronas GABA del tipo D1, ya que la expresión del gen Cre es dependiente del promotor del receptor de dopamina tipo 1 (D1). El análisis de la expresión de Cre en el cerebro de estos animales, muestra una elevada expresión de esta proteína en el cuerpo estriado cerebral (que incluye el núcleo accumbens), corteza e hipotálamo (Gensat, id: EY217; <http://www.gensat.org/cre.jsp>). Por lo tanto, la generación y administración estereotóxica en el núcleo accumbens de un vector adenoasociado (AAV) codificante de la subunidad α 1 (KK385/386AA) de forma Cre dependiente permitiría expresar de forma específica este gen de interés en neuronas GABA tipo D1 del núcleo accumbens. En este contexto, el objetivo de esta tesis fue generar y estudiar la funcionalidad de un vector AAV que codifique para la subunidad α 1 del receptor de glicina humano mutado (KK385/386AA) y lo exprese de forma condicional a la recombinasa Cre.

La hipótesis de este trabajo indicaba que la generación de vectores adenoasociados codificante de GlyR α 1 mutado, flanqueado por sitios *loxP* invertidos, permitía su expresión en células que expresaran la recombinasa Cre. Aunque no se llegó a generar los vectores adenoasociados, sí se logró generar el plásmido precursor del vector, codificando el cDNA de la subunidad α 1 del receptor de glicina con los cambios aminoacídicos KK385/386AA y

se confirmó la funcionalidad de éste mediante electrofisiología e inmunocitoquímica. A continuación, se discutirán los principales resultados obtenidos, analizando las implicancias, debilidades y fortalezas del trabajo realizado en esta tesis.

8.1. Validación del plásmido pAAV-DIO-GlyR-mCitrine.

Como material inicial para el desarrollo de esta tesis, se recibió el plásmido pAAV-DIO-GlyR-mCitrine que teóricamente codificaba el cDNA de la subunidad $\alpha 1$ del receptor de glicina humano (GlyR $\alpha 1$) flanqueado por secuencias *loxP*, que permiten su expresión dependiente de Cre. Mediante secuenciación, se determinó que la secuencia nucleotídica de GlyR presente en el plásmido pAAV-DIO-GlyR $\alpha 1$ *wt*-mCitrine tenía una identidad de 100% con el cDNA de la variante transcripcional 2 del gen de la subunidad alfa 1 del receptor de glicina humano. Existen 2 isoformas de GlyR $\alpha 1$ humano, generados por corte y empalme alternativo. La isoforma 1 posee 8 aminoácidos adicionales en el dominio intracelular (IL). Ambas isoformas han demostrado formar un canal sensible a cloruro funcional, exhibiendo propiedades farmacológicas similares (Malosio y cols., 1991; Legendre y cols., 2009). No obstante, no se han realizado estudios comparando la capacidad de potenciación del etanol de estas variantes, las que podrían mostrar diferencias debido a que poseen variaciones en el dominio intracelular, el cual es fundamental en la potenciación de etanol (Yévenes y cols., 2008). En ratón se conocen 2 isoformas de GlyR $\alpha 1$, los cuales presentan un 99% de homología con los de humanos, además se ha demostrado que las corrientes iónicas mediadas por el GlyR $\alpha 1$ también pueden ser potenciadas por alcohol (Förstera y cols., 2017).

8.2. Expresión Cre-dependiente de GlyR $\alpha 1$ en las líneas celulares.

Debido a que las líneas celulares no expresan normalmente la recombinasa Cre, se adquirió el plásmido comercial pLV-Cre que codificaba para esta proteína. Sin embargo, se presentaron dificultades para purificar este plásmido en una cantidad suficiente para co-transfectarlo en células junto al plásmido codificante de GlyR $\alpha 1$. Esto pudo deberse a que pLV-Cre es un plásmido que genera un bajo número de copias en cultivo bacteriano (Addgene plasmid #12106, <https://www.addgene.org/12106/>). Los factores que influyen en el número de copias de un plásmido son su tamaño y el tipo de origen de replicación que posea. A mayor tamaño de plásmido, más se retarda el crecimiento bacteriano y se generan

bajos rendimientos del plásmido (O'Hanlon, 2015, <https://bitesizebio.com/22824/>), lo que se podría correlacionar con el tamaño relativamente grande de LV-Cre (9 kb). El origen de replicación que posee pLV-Cre es proveniente del plásmido pBR322, que es un origen de replicación de bajo número de copias (genera entre 15-20 copias), a diferencia de un origen de replicación de alto número de copias que puede generar 500-700 copias (Anindyajati y cols., 2016; Wood y cols., 2017). La elección de utilizar un origen de replicación de bajo número de copias en LV-Cre podría deberse a la posible toxicidad de Cre en cultivos bacterianos, ya que la transcripción de Cre en este plásmido está comandada por el promotor de Citomegalovirus, un promotor fuerte que se ha demostrado ser activo en *Escherichia coli* (Lewin y cols., 2005). No obstante, el uso de plásmidos con orígenes de replicación de alto número de copias derivados de la mutación del Ori presente en pBR322, no generan un mayor rendimiento de plásmido. Esto se explicaría a la falta de un sistema eficiente de control del número de copias en las bacterias, lo que genera una distribución desigual de las copias del plásmido en las bacterias generadas y la pérdida del plásmido en alguna de ellas (Summers, 1996).

Debido al bajo rendimiento de pLV-Cre no se pudo obtener una cantidad adecuada mediante el uso de un kit de purificación. Por lo tanto, se optó por purificar el plásmido mediante el método de lisis alcalina a partir de un gran volumen de cultivo, seguido de tratamiento con RNasa y extracción con fenol/cloroformo, lo que efectivamente aumentó el rendimiento del proceso, pero implicó un menor nivel de pureza del plásmido obtenido. Utilizando esta preparación se co-transfectó células HEK-293 con los plásmidos pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine y pLV-Cre utilizando como agente transfectante polietilenimina. Los resultados mostraron que no hubo expresión de los genes codificados en pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine en esta línea celular.

Es posible que estos resultados negativos se deban a tres factores: i) una baja actividad del promotor de sinapsina I (que comanda la expresión de pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine) en células HEK-293, ii) una baja expresión de la proteína Cre desde pLV-Cre, la que es necesaria para la expresión de pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine, y/o iii) que el agente transfectante utilizado tenga una reducida efectividad en las condiciones experimentales ensayadas.

Si bien, se ha demostrado que el promotor de sinapsina I es funcional en células HEK-293, hay estudios que indican que induce una baja expresión de los transgenes en aquella línea celular (Boulos y cols., 2006). Además, se ha demostrado que el promotor de sinapsina I tiene mayor actividad en células de tipo neuronales (Thiel y cols., 1991; Schoch y cols., 1996). Por esta razón, se decidió realizar los experimentos de co-tranfección en la línea celular de tipo neuronal PC-12, la cual no expresa GlyR y en la que el promotor de sinapsina I es funcional (Heck y cols., 1997; Thiel y cols., 1991). Otro cambio que se realizó fue sub-clonar el gen de Cre en el plásmido pAAV-MCS. Este vector tiene un tamaño de 4650 pb, mucho menor a pLV-Cre, lo que podía incidir en una mejor eficiencia de transfección (Kreiss et al., 1999). Además, posee un origen de replicación de pUC de alto número de copias (Anindyajati et al., 2016; Life Science Market, <https://www.lifescience-market.com/plasmid-c-94/paav-mcs-plasmid-p-63656.html>), lo que aumenta el rendimiento de su purificación. Además de los cambios mencionados, se cambió el tipo de agente de transfección utilizado, reemplazando PEI por el reactivo Lipofectamina2000 (Thermo Fisher Sci.). Al co-transfectar células PC-12 con los plásmidos pAAV-DIO-GlyR α 1 wt -mCitrine y pAAV-Cre en estas condiciones, se detectó la fluorescencia del reportero mCitrina, lo que implicaba también la posible expresión de GlyR (**Figura 8**).

Dado que la eficiencia de transfección de un mismo agente transfectante varía según el tipo celular (Maurisse y cols., 2010), es importante comparar la capacidad de estos agentes en una misma línea celular. Lee y cols. (2008), realizaron un estudio comparando el uso de PEI y de Lipofectamina 2000 como agentes transfectantes de un plásmido de 4,7 kb en células PC-12, el estudio arrojó que ambos agentes producen eficiencias de transfección de baja magnitud, pero similares (14% con Lipofectamina 2000 y 15% con PEI). Tomando en consideración este antecedente, es posible que la nula expresión de pAAV-DIO-GlyR α 1 wt -mCitrine al co-tranfectar PC-12 usando PEI se deba a que este agente no presente la misma eficiencia al transfectar plásmidos de mayor tamaño como pAAV-DIO-GlyR α 1 wt -mCitrine (7 kb).

Se optimizó también la proporción de los plásmidos utilizados en la co-transfección y la relación total plásmido-lipofectamina2000. Se determinó que la condición en donde se

observa mayor cantidad de células fluorescentes es utilizando 0,13 μg de pAAV-Cre + 0,87 μg de pAAV-GlyR α 1-mCitrine, con 6 μl de lipofectamina2000, con una eficiencia de transfección menor a un 1%. Si bien, la eficiencia de transfección reportada utilizando lipofectamina 2000 es de alrededor de un 15% (Lee y cols., 2008; Covello y cols., 2014), era esperable obtener eficiencias más bajas que las reportadas, considerando los siguientes aspectos: i) el tamaño de los plásmidos, ii) es menos probable que 2 plásmidos distintos se incorporen a una célula que si fuese uno solo, iii) que para que se exprese GlyR α 1 debe ocurrir un evento de recombinación previo mediado por Cre entre los sitios *loxP*, y iv) que el promotor de sinapsina I es un promotor de baja actividad en relación a otros promotores con acción sobre células neuronales (Boulos y cols., 2006).

Otro método estudiado para la co-transfección de las células PC-12 fue la electroporación, un método que ha demostrado generar una elevada eficiencia de transfección en células PC-12 (70-90%), muy por sobre la transfección con PEI (15%) y lipofectamina 2000 (14%) (Covello y cols., 2014). El resultado obtenido de la electroporación mostró que no hubo expresión de los genes codificados en pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine en la co-transfección, no obstante, mostró una elevada expresión del plásmido pmCitrine-N1 (control positivo) indicado por la fluorescencia de la proteína reportera mCitrina (alrededor de un 80% de eficiencia de transfección). Esto podría deberse al tamaño relativamente grande del plásmido pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine (7kb), ya que la sobrevida y eficiencia de transfección en la electroporación, se correlacionan inversamente con el tamaño del plásmido utilizado (Lesueur et al., 2016). Otra explicación podría ser que la electroporación pudo haber afectado negativamente procesos involucrados en la actividad de recombinación de los plásmidos co-transfectados.

Un experimento que podría haber ayudado en determinar si LV-Cre o pAAV-Cre expresaban la recombinasa Cre era la detección de los niveles relativos de Cre mediante Western blot. Un experimento de este tipo podría haber ayudado a correlacionar el tamaño del plásmido y su método de purificación con la expresión de Cre. A pesar de estar disponibles comercialmente, no fue posible adquirir un anticuerpo anti Cre debido a restricciones económicas.

Si bien, el péptido de GlyR α 1 codificado en pAAV-DIO-GlyR α 1-mCitrine se expresa sólo en un contexto Cre, también es posible la expresión del RNA del casete invertido GlyR α 1-IRES-mCitrine codificado en tal plásmido cuando está ausente aquella recombinasa, debido a que en su secuencia posee los sitios necesarios para comandar su transcripción. Esto permitiría la generación de un RNA antisentido complementario al mRNA de GlyR α 1. Debido a que los RNA antisentido pueden inhibir la expresión de sus genes blanco (Xu y cols., 2018), potencialmente el plásmido pAAV-DIO-GlyR α 1-mCitrine podría afectar la expresión de GlyR α 1. Sería necesario el desarrollo de nuevos estudios *in vitro* para demostrar o descartar esta posible interferencia en la expresión de GlyR α 1 por la construcción pAAV-DIO-GlyR α 1-mCitrine.

8.3. Vectores virales adenoasociados como agentes de entrega génica.

El plásmido de entrega de GlyR α 1 se utilizará para desarrollar vectores adenoasociados (AAV) que serán administrados mediante cirugía estereotáctica en el núcleo accumbens de ratones D1-Cre, *in vivo*. Los vectores virales adenoasociados (AAV) son una herramienta adecuada para este propósito, ya que las versiones recombinantes de estos virus se utilizan ampliamente para la transferencia de genes en el SNC debido a que no son patogénicos, generan una baja respuesta inmune comparada con otros vectores virales y poseen una expresión prolongada del gen de interés en el tiempo (Howarth y cols., 2010; Qu y cols., 2019). Dado que los virus AAV poseen múltiples serotipos (se han identificado 12), que varían según el tipo de proteína que posean en la cápside, presentan tropismo por diferentes tejidos celulares dependiendo del tipo de receptor diana que reconocen (Naso y cols., 2017; Bennett y cols., 2017). Por lo tanto, una correcta elección del serotipo es fundamental para los resultados que se obtengan en los experimentos *in vivo*. Los vectores AAVs se generan comúnmente mediante la co-transfección de células HEK-293 con 3 plásmidos: a) el plásmido codificante del gen de interés (en este caso podría ser pAAV-DIO-GlyR α 1mut-mCitrine), b) un plásmido ayudador que contiene genes de adenovirus y c) un plásmido que contiene genes Rep y Cap (necesarios para la replicación y el empaquetamiento del virión, respectivamente) (Agilent Technologies 2015, <https://www.agilent.com/cs/library>). El serotipo en los virus AAV recombinantes está determinado por las variantes del gen Cap (que codifica proteínas de la cápside), el cual es suplementado en *trans* por un plásmido

(addgene, <https://www.addgene.org/guides/aav/>). En este sentido, el serotipo AAV5 es el que ha mostrado generar mayor expresión en el cuerpo estriado, región donde se ubica el núcleo accumbens (Aschauer y cols., 2013). No obstante, la generación de mutaciones puntuales en las proteínas de la cápside y la generación de cápsides quiméricas son nuevos enfoques tendientes para mejorar la especificidad de tropismo de los vectores AAV (Lee y cols., 2018).

Hay pocos estudios sobre el uso de vectores virales como agentes de entrega de GlyR α 1. Morr y cols. (1995) elaboraron un virus recombinante de Baculovirus (un virus infeccioso para invertebrados) que codifica para GlyR α 1 para infectar células Sf9, una línea celular de insecto, con el objetivo de producir cantidades adecuadas de GlyR α 1 para ser purificada y posteriormente utilizada en ensayos de cristalografía. Adicionalmente, Gross y cols. (2011) elaboraron un virus recombinante de Herpes Simplex que codifica para GlyR α 1 para infectar cultivos primarios de neuronas de ratas, con el objetivo de estudiar el efecto de GlyR α 1 en el control del dolor. Sin embargo, no hay reportes en la literatura del uso in vivo de estos vectores, ni tampoco estudios publicados en los que se utilicen vectores virales adenoasociados para expresar GlyR α 1 bajo el control de la recombinasa Cre.

8.4. Respuesta Inmune del vector AAV.

Si bien los vectores adenoasociados se caracterizan por generar una baja respuesta inmune innata (Nayak y Herzog, 2010), la principal barrera para una terapia génica efectiva es la inmunidad pre-existente debido a que los humanos pueden estar expuestos a virus AAV silvestres (que no generan cuadros patológicos). Sumado a esto, la alta homología de las proteínas de la cápside entre los serotipos de estos virus puede generar un reconocimiento de la cápside de los virus AAV recombinantes por parte anticuerpos neutralizantes y linfocitos T, disminuyendo la efectividad del tratamiento (Mingozzi, 2018; Vandamme y cols., 2017). Por lo tanto, un posible desarrollo a futuro de terapias génicas con el gen GlyR α 1 de humano debe considerar esta limitante.

Una forma de superar la limitación de la inmunidad pre-existente en terapias para el sistema nervioso central de humano es realizando una inyección directa en el cerebro o en la médula espinal, ya que se ha demostrado que hay un muy bajo título de anticuerpos en el sistema nervioso central (Lykken y cols., 2018). Otra opción es desarrollar vectores AAV

recombinantes que posean una cápside modificada, la cual no sea reconocida por el sistema inmune adaptativo (Basner-Tschakarjan y cols., 2014).

En ratones no hay inmunidad pre-existente contra virus AAV, debido a que no son hospederos naturales de este tipo de virus (Zinn y Vandenberghe, 2014; Kuranda y cols., 2018). Además, debido a que la proteína de GlyR α 1 $_{wt}$ y GlyR α 1 $_{mut}$ humanas comparten un 99% y 98,4% de homología con la de ratón, respectivamente (datos obtenidos de NCBI, EE. UU.), la infección de ratones con un vector viral AAV que codifique para GlyR α 1 humano no debería generar una activación de la respuesta inmune adaptativa en ese modelo animal.

8.5. Estudio de la expresión de GlyR α 1 $_{wt}$ y GlyR α 1 $_{mut}$ mediante RT-PCR.

Mediante RT-PCR y posterior análisis de restricción, en esta tesis fue posible detectar y diferenciar la expresión de GlyR α 1 y GlyR α 1 $_{mut}$ en las células PC-12. La base de la diferenciación se basó en la presencia de un sitio de restricción SacII en el cDNA de GlyR α 1 $_{mut}$ que no estaba presente en GlyR α 1. Sin embargo, en los resultados presentados en la **Figura 21**, se observa para GlyR α 1 $_{mut}$ un fragmento de 705 pb sin digerir, lo que no era esperado. Esto se podría explicar por: i) que la actividad enzimática de SacII haya sido menor a la óptima, produciéndose solo una digestión parcial del fragmento, lo cual es poco probable, ya que se evaluó el uso de una mayor cantidad de enzima en más tiempo de digestión y aun así se mantuvo un fragmento sin digerir en cantidades similares a las iniciales; y ii) que haya habido contaminación de la muestra que contenía GlyR α 1 $_{mut}$ con la muestra de GlyR α 1 $_{wt}$ en alguna etapa del proceso de la RT-PCR y/o de la PCR convencional, correspondiendo el fragmento sin digerir a un amplicón de GlyR α 1 $_{wt}$.

8.6. Cell sorting e inmunocitoquímica.

Debido a que los rendimientos obtenidos de la co-transfección de los plásmidos que codifican GlyR α 1 con pAAV-Cre siempre fueron muy bajos, de alrededor de un 1% o menos, se hacía muy poco probable detectar células positivas para GlyR α 1 mediante *western blot* e incluso mediante inmunocitoquímica, técnica que tiene incluso una mayor sensibilidad. Para demostrar la expresión de la proteína GlyR α 1 mediante inmunocitoquímica fue necesario enriquecer las preparaciones con las células efectivamente transfectadas. Para

ello se aprovechó el hecho de que GlyR α 1 se debía co-expresar con el reportero mCitrina (ver **Figura 8**) y la disponibilidad de un servicio de *Cell Sorting* en la facultad. Esta técnica permite separar poblaciones celulares de acuerdo con la presencia de proteínas fluorescentes y/o fluoróforos asociados a anticuerpos. De esta forma, fue posible obtener preparaciones celulares que efectivamente expresaban el reportero mCitrina. Además, confirmó que la eficiencia de transfección basada en la medición del reportero fue menor al 1%.

El uso de este método fue efectivo, ya que los resultados de la inmunocitoquímica mostraron que hay detección de la proteína GlyR α 1 tanto en las células PC-12 co-transfectadas con pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine/pAAV-Cre como con pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{mut}$ -mCitrine/pAAV-Cre. Otro aspecto relevante de los estudios de inmunocitoquímica fue que la marca fluorescente tanto para GlyR α 1 y GlyR α 1 $_{mut}$ se observó en la periferia de las células, lo que sería concordante con una proteína que forma un receptor del tipo canal iónico en la membrana celular. Hubiese sido deseable haber contado con un plásmido control positivo para GlyR α 1, que se expresara de forma abundante en las células PC12, para haber confirmado de mejor forma los resultados obtenidos con los plásmidos adenoasociados dependientes de Cre. Por otra parte, la expresión del marcador mCitrina se observa en toda la extensión celular, lo que era esperable para la distribución citoplasmática del reportero fluorescente.

8.7. Estudios electrofisiológicos.

Para estudiar la funcionalidad del canal iónico formado a partir de las subunidades de GlyR α 1 codificadas en los plásmidos pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine y pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{mut}$ -mCitrine, se realizaron registros electrofisiológicos de “*patch clamp*” mediante la configuración de “*whole cell*” de células PC-12 co-transfectadas con pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine/pCre-GFP y en las co-transfectadas con pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{mut}$ -mCitrine/pCre-GFP.

Los resultados muestran que al estimular localmente una célula PC-12 con 1 mM glicina, se observó una corriente iónica en cultivos co-transfectados con pAAV-DIO-GlyR α 1 $_{wt}$ -mCitrine/pCre-GFP, lo que también ocurrió en los cultivos co-transfectados con pAAV-

DIO-GlyR α 1mut-mCitrine/pCre-GFP. Dando cuenta de que tanto GlyR α 1 wt como GlyR α 1mut forman un canal iónico funcional.

Comparando los gráficos de corriente vs tiempo (pA/s) de GlyR α 1 wt con GlyR α 1mut, se observa que GlyR α 1mut posee una desactivación más rápida del canal que GlyR α 1 wt , entendida como la transición entre el estado abierto del canal al estar unido a su ligando y el cerrado aún en presencia del ligando (Langlhofer y Villmann, 2016). Esa diferencia se podría deber a que se ha visto que el dominio intracelular, que es donde se encuentra la mutación en GlyR α 1mut, posee un rol en las propiedades de apertura del canal como la conductancia y la desactivación del canal (Kumar y cols., 2019; Langlhofer y Villmann, 2016; Papke y Grosman, 2014). No obstante, debido a que esos efectos se estudiaron en una sola célula, queda por dilucidar si esa diferencia entre GlyR α 1 wt y GlyR α 1mut es reproducible en mayor número de muestras de células.

9. CONCLUSIONES

- Se logró generar un cDNA de la subunidad alfa1 del receptor de glicina humano, que codifica para una proteína con los cambios aminoacídicos KK385/386AA.
- Se logró incorporar tanto el cDNA de la subunidad alfa1 del receptor de glicina humano silvestre (*GlyR α 1_{wt}*) como el cDNA de la subunidad alfa1 del receptor de glicina humano con los cambios KK385/386AA (*GlyR α 1_{mut}*), en un plásmido precursor de vectores adenoasociados tipo Cre-dependiente.
- Mediante estudios de RT-PCR y PCR convencional, se demostró que ambos mRNAs (*GlyR α 1_{wt}* y *GlyR α 1_{mut}*), se expresan correctamente en células de feocromocitoma de rata (PC-12), bajo un contexto de expresión de la recombinasa Cre.
- Mediante estudios de inmunocitoquímica, se demostró que ambos cDNAs (*GlyR α 1_{wt}* y *GlyR α 1_{mut}*), generan una proteína reconocible por un anticuerpo anti *GlyR α 1* en células PC12, bajo un contexto de expresión de Cre.
- Mediante estudios de electrofisiología, se demostró que ambos cDNAs (*GlyR α 1_{wt}* y *GlyR α 1_{mut}*), generan un canal iónico funcional sensible a la estimulación con glicina en células PC-12, bajo un contexto de expresión de Cre.
- Los plásmidos adenoasociados codificantes de *GlyR α 1_{wt}* y *GlyR α 1_{mut}*, generados en esta tesis, son adecuados para la generación de vectores virales adenoasociados que expresen, bajo un contexto Cre, las proteínas *GlyR α 1_{wt}* o *GlyR α 1_{mut}*. Estos vectores serán utilizados para experimentos *in vivo*.

CONCLUSIÓN GENERAL:

Se generó un plásmido precursor de vectores adenoasociados (AAV), codificante de la subunidad $\alpha 1$ mutada (KK385/386AA) del receptor de glicina (GlyR), flanqueada por sitios loxP invertidos. Este plásmido, presenta la expresión de un GlyR funcional, exclusivamente en células que expresan la recombinasa Cre.

10. REFERENCIAS

- Addgene. AAV Guide. Recuperado de: <https://www.addgene.org/guides/aav/>.
- Agilent Technologies (2015). AAV Helper-Free System, Instruction Manual. Recuperado de: <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/240071.pdf>.
- Aguayo, L. G., & Pancetti, F. C. (1994). Ethanol modulation of the gamma-aminobutyric acidA- and glycine-activated Cl⁻ current in cultured mouse neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, 270(1), 61-9.
- Aguayo, L. G., Tapia, J. C., & Pancetti, F.C. (1996). Potentiation of the glycine-activated Cl⁻ current by ethanol in cultured mouse spinal neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, 279(3), 1116-22.
- Aguayo, L. G., van Zundert, B., Tapia, J. C., Carrasco, M. A., & Alvarez, F. J. (2004). Changes on the properties of glycine receptors during neuronal development. *Brain Res Brain Res Rev*, 47(1-3), 33-45.
- Aguayo, L. G., Castro, P., Mariqueo, T., Munoz, B., Xiong, W., Zhang, L., ... & Homanics, G. E. (2014). Altered sedative effects of ethanol in mice with $\alpha 1$ glycine receptor subunits that are insensitive to G $\beta\gamma$ modulation. *Neuropsychopharmacology*, 39(11), 2538.
- Anindyajati, Artarini A. A., Riani, C., & Retnoningrum, D. S. (2016). Plasmid copy number determination by quantitative polymerase chain reaction. *Sci Pharm*, 84(1), 89.
- Aprison, M. H., Shank, R. P., Davidoff, R. A., & Werman, R. (1968). The distribution of glycine, a neurotransmitter suspect in the central nervous system of several vertebrate species. *Life Sci*, 7(11), 583-90.
- Aschauer, D. F., Kreuz, S., & Rumpel, S. (2013). Analysis of transduction efficiency, tropism and axonal transport of AAV serotypes 1, 2, 5, 6, 8 and 9 in the mouse brain. *PloS one*, 8(9).
- Aubrey, K. R. (2016). Presynaptic control of inhibitory neurotransmitter content in VIAAT containing synaptic vesicles. *Neurochem Int*, 98, 94-102.
- Basner-Tschakarjan, E., Bijjiga, E., & Martino, A. T. (2014). Pre-clinical assessment of immune responses to adeno-associated virus (AAV) vectors. *Front Immunol*, 5, 28.
- Begbie, S., Dominelli, G., Duthie, K., Holland, J., & Jitratkosol, M. (2005). The effects of sub-inhibitory levels of chloramphenicol on pBR322 plasmid copy number in Escherichia coli DH5a cells. *J Exp Microbiol Immunol*, 7, 82-88.

- Bennett, A., Patel, S., Mietzsch, M., Jose, A., Lins-Austin, B., Yu, J. C., ... & Agbandje-McKenna, M. (2017). Thermal stability as a determinant of AAV serotype identity. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 6, 171-182.
- Blednov, Y. A., Benavidez, J. M., Homanics, G.E., & Harris, R. A. (2012). Behavioral characterization of knockin mice with mutations M287L and Q266I in the glycine receptor $\alpha 1$ subunit. *J Pharmacol Exp Ther*, 340, 317-29.
- Bormann, J., Rundström, N., Betz, H., & Langosch, D. (1993). Residues within transmembrane segment M2 determine chloride conductance of glycine receptor homo- and hetero-oligomers. *EMBO J*, 12(10), 3729-37.
- Boulos, S., Meloni, B. P., Arthur, P. G., Bojarski, C., & Knuckey, N. W. (2006). Assessment of CMV, RSV and SYN1 promoters and the woodchuck post-transcriptional regulatory element in adenovirus vectors for transgene expression in cortical neuronal cultures. *Brain Res*, 1102(1), 27-38.
- Bowery, N. G., & Smart, T. G (2006). GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. *Br J Pharmacol*, 147(S1), S109-19.
- Bradley, R. J., Peper, K., & Sterz, R. (1980) Postsynaptic effects of ethanol at the frog neuromuscular junction. *Nature*, 284(5751), 60-2.
- Burgos, C. F., Muñoz, B., Guzman, L., & Aguayo, L. G. (2015). Ethanol effects on glycinergic transmission: from molecular pharmacology to behavior responses. *Pharmacological research*, 101, 18-29.
- Burgos, C. F., Yévenes, G. E., & Aguayo, L. G. (2016). Structure and pharmacologic modulation of inhibitory glycine receptors. *Molecular pharmacology*, 90(3), 318-25.
- Covello, G., Siva, K., Adami, V., & Denti, M. A. (2014). An electroporation protocol for efficient DNA transfection in PC12 cells. *Cytotechnology*, 66(4), 543-553.
- Crawford, D. K., Trudell, J. R., Bertaccini, E. J., Li, K., Davies, D. L., & Alkana, R. L. (2007). Evidence that ethanol acts on a target in Loop 2 of the extracellular domain of $\alpha 1$ glycine receptors. *Journal of neurochemistry*, 102(6), 2097-109.
- Di Chiara, G., & Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 185(14), 5274-8.
- Eggers, E. D., O'Brien, J. A., & Berger, A. J. (2000). Developmental changes in the modulation of synaptic glycine receptors by ethanol. *J Neurophysiol*. 84(5), 2409-16.
- Engblom, A. C., & Akerman, K. E. (1991). Effect of ethanol on gamma-aminobutyric acid and glycine receptor-coupled Cl⁻ fluxes in rat brain synaptoneurosome. *J Neurochem*, 57(2), 384-90.

- Ericson, M., Molander, A., Löf, E., Engel, J. A., & Söderpalm, B. (2003). Ethanol elevates accumbal dopamine levels via indirect activation of ventral tegmental nicotinic acetylcholine receptors. *Eur J Pharmacol*, 467(1-3), 85-93.
- Findlay, G. S., Harris, R. A., & Blednov, Y. A. (2005). Male transgenic glycine receptor $\alpha 1$ (S267Q) mutant mice display a hyperekplexia-like increase in acoustic startle responses. *Pharmacol Biochem Behav*, 82(1), 215-222.
- Förster, B., Muñoz, B., Lobo, M. K., Chandra, R., Lovinger, D. M., & Aguayo, L. G. (2017). Presence of ethanol-sensitive glycine receptors in medium spiny neurons in the mouse nucleus accumbens. *J Physiol*, 595(15), 5285-300.
- Gene Expression Nervous System Atlas (GENSAT). Cepa Tg(Drd1-cre)EY217Gsat/Mmucd. Recuperado de: <http://www.gensat.org/cre.jsp>.
- Griffon, N., Büttner, C., Nicke, A., Kuhse, J., Schmalzing, G., & Betz, H. (1999). Molecular determinants of glycine receptor subunit assembly. *EMBO J*, 18(17), 4711-21.
- Goss, J. R., Cascio, M., Goins, W. F., Huang, S., Krisky, D. M., Clarke, R. J., ... & Glorioso, J. C. (2011). HSV delivery of a ligand-regulated endogenous ion channel gene to sensory neurons results in pain control following channel activation. *Mol Ther*, 19(3), 500-506.
- Guzman, L., Moraga-Cid, G., Avila, A., Figueroa, M., Yevenes, G. E., Fuentealba, J., & Aguayo, L. G. (2009). Blockade of ethanol-induced potentiation of glycine receptors by a peptide that interferes with Gbetagamma binding. *J Pharmacol Exp Ther*, 331(3), 933-9.
- Harvey, R. J., Schmieden, V., Von Holst, A., Laube, B., Rohrer, H., & Betz, H. (2000). Glycine receptors containing the alpha4 subunit in the embryonic sympathetic nervous system, spinal cord and male genital ridge. *Eur J Neurosci*, 12(3), 994-1001.
- Heck, S., Enz, R., Richter-Landsberg, C., & Blohm, D. H. (1997). Expression and mRNA splicing of glycine receptor subunits and gephyrin during neuronal differentiation of P19 cells in vitro, studied by RT-PCR and immunocytochemistry. *Brain Res Dev Brain Res*, 98(2), 211-20.
- Hernandes, M. S., & Troncone, L. R. (2009). Glycine as a neurotransmitter in the forebrain: a short review. *J Neural Transm*, 116(12), 1551-60.
- Howarth, J. L., Lee, Y. B., & Uney, J. B. (2010). Using viral vectors as gene transfer tools (Cell Biology and Toxicology Special Issue: ETCS-UK 1 day meeting on genetic manipulation of cells). *Cell Biol Toxicol*, 26(1), 1-20.
- Huttner, W. B. (1993). Cell biology. Snappy exocytosis. *Nature*, 365(6442), 104.

- Jonsson, S., Adermark, L., Ericson, M., & Söderpalm, B. (2014). The involvement of accumbal glycine receptors in the dopamine-elevating effects of addictive drugs. *Neuropharmacology*, 82, 69-75.
- Kobayashi, T., Ikeda, K., Kojima, H., Niki, H., Yano, R., Yoshioka, T., Kumanishi, T. (1999). Ethanol opens G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels. *Nat Neurosci*, 2(12), 1091-7.
- Kreiss, P., Cameron, B., Rangara, R., Mailhe, P., Aguerre-Charriol, O., Airiau, M., ... & Pitard, B. (1999). Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic Acids Res*, 27(19), 3792–3798.
- Kühn, R., & Torres, R. M. (2002). Cre/loxP recombination system and gene targeting. *Methods Mol Biol*, 180, 175-204.
- Kumar, A., Basak, S., Rao, S., Gicheru, Y., Mayer, M. L., Sansom, M. S., & Chakrapani, S. (2019). Mechanisms of activation and desensitization of full-length glycine receptor in membranes. *bioRxiv*, 788695.
- Kuranda, K., Jean-Alphonse, P., Leborgne, C., Hardet, R., Collaud, F., Marmier, S., ... & Mingozzi, F. (2018). Exposure to wild-type AAV drives distinct capsid immunity profiles in humans. *J Clin Invest*, 128(12), 5267-5279.
- Langlhofer, G., & Villmann, C. (2016). The intracellular loop of the glycine receptor: it's not all about the size. *Front Mol Neurosci*, 9, 41.
- Larsson, A., Edström, L., Svensson, L., Söderpalm, B., & Engel, J. A. (2005). Voluntary ethanol intake increases extracellular acetylcholine levels in the ventral tegmental area in the rat. *Alcohol Alcohol*, 40(5), 349-58.
- Lee, E. J., Guenther, C. M., & Suh, J. (2018). Adeno-associated virus (AAV) vectors: rational design strategies for capsid engineering. *Curr Opin Biomed Eng*, 7, 58-63.
- Lee, J. H., Ahn, H. H., Kim, K. S., Lee, J. Y., Kim, M. S., Lee, B., ... & Lee, H. B. (2008). Polyethyleneimine-mediated gene delivery into rat pheochromocytoma PC-12 cells. *J Tissue Eng Regen Med*, 2(5), 288-295.
- Legendre, P. (2001). The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci*, 58(5-6), 760-93.
- Legendre, P., Förstera, B., Jüttner, R., & Meier, J. C. (2009). Glycine receptors caught between genome and proteome-functional implications of RNA editing and splicing. *Front Mol Neurosci*, 2, 23.
- Lesueur, L. L., Mir, L. M., & André, F. M. (2016). Overcoming the specific toxicity of large plasmids electrotransfer in primary cells in vitro. *Mol Ther Nucleic Acids*, 5, e291.

- Lewin, A., Mayer, M., Chusainow, J., Jacob, D., & Appel, B. (2005). Viral promoters can initiate expression of toxin genes introduced into *Escherichia coli*. *BMC biotechnol*, 5(1), 19.
- Lobo, I. A., Mascia, M. P., Trudell, J. R., & Harris, R. A. (2004). Channel gating of the glycine receptor changes accessibility to residues implicated in receptor potentiation by alcohols and anesthetics. *J Biol Chem*, 279(32), 33919-27.
- Löf, E., Ericson, M., Stomberg, R., & Söderpalm, B. (2007). Characterization of ethanol-induced dopamine elevation in the rat nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol*, 555(2-3), 148-55.
- Lovinger, D. M., & White, G. (1991). Ethanol potentiation of 5-hydroxytryptamine₃ receptor-mediated ion current in neuroblastoma cells and isolated adult mammalian neurons. *Mol Pharmacol*, 40(2), 263-70.
- Lovinger, D. M., White, G., & Weight, F. F. (1989). Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science*, 243(4899), 1721-4.
- Lykken, E. A., Shyng, C., Edwards, R. J., Rozenberg, A., & Gray, S. J. (2018). Recent progress and considerations for AAV gene therapies targeting the central nervous system. *J Neurodev Disord*, 10(1), 16.
- Lynch, J. W. (2009). Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology*, 56(1), 303-9.
- Malosio, M. L., Grenningloh, G., Kuhse, J., Schmieden, V., Schmitt, B., Prior, P., & Betz, H. (1991). Alternative splicing generates two variants of the alpha 1 subunit of the inhibitory glycine receptor. *J Biol Chem*, 266(4), 2048-2053.
- Mascia, M. P., Mihic, S. J., Valenzuela, C. F., Schofield, P. R., & Harris, R. A. (1996). A single amino acid determines differences in ethanol actions on strychnine-sensitive glycine receptors. *Mol Pharmacol*, 50(2), 402-6
- Maurisse, R., De Semir, D., Enamekhoo, H., Bedayat, B., Abdolmohammadi, A., Parsi, H., & Gruenert, D. C. (2010). Comparative transfection of DNA into primary and transformed mammalian cells from different lineages. *BMC biotechnol*, 10(1), 9.
- Meyer, G., Kirsch, J., Betz, H., & Langosch, D. (1995). Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor beta subunit. *Neuron*, 15(3), 563-72.
- Mihic, S. J., Ye, Q., Wick, M. J., Koltchine, V. V., Krasowski, M. D., Finn, S. E., ... & Harrison, N. L. (1997). Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors. *Nature*, 389(6649), 385-9.
- Mingozzi, F. (2018). AAV immunogenicity: a matter of sensitivity. *Mol Ther*, 26(10), 2335.

- Molander, A., & Söderpalm, B. (2005b) Accumbal strychnine-sensitive glycine receptors: an access point for ethanol to the brain reward system. *Alcohol Clin Exp Res*, 29(1), 27-37.
- Molander, A., & Söderpalm, B. (2005a). Glycine receptors regulate dopamine release in the rat nucleus accumbens. *Alcohol Clin Exp Res*, 29(1), 17-26.
- Molander, A., Löf, E., Stomberg, R., Ericson, M., & Söderpalm, B. (2005). Involvement of accumbal glycine receptors in the regulation of voluntary ethanol intake in the rat. *Alcohol Clin Exp Res*, 29(1), 38-45.
- Molander, A., Lidö, H. H., Löf, E., Ericson, M. & Söderpalm, B. (2007). The glycine reuptake inhibitor Org 25935 decreases ethanol intake and preference in male wistar rats. *Alcohol Alcohol*, 42(1), 11-8.
- Morr, J., Rundström, N., Betz, H., Langosch, D., & Schmitt, B. (1995). Baculovirus-driven expression and purification of glycine receptor $\alpha 1$ homo-oligomers. *FEBS Lett*, 368(3), 495-499.
- Muñoz, B., Gallegos, S., Peters, C., Murath, P., Lovinger, D. M., Homanics, G. E., & Aguayo, L. G. (2019). Influence of nonsynaptic $\alpha 1$ glycine receptors on ethanol consumption and place preference. *Addiction Biology*.
- Naso, M. F., Tomkowicz, B., Perry, W. L., & Strohl, W. R. (2017). Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy. *BioDrugs*, 31(4), 317-334
- Nayak, S., & Herzog, R. W. (2010). Progress and prospects: immune responses to viral vectors. *Gene Ther*, 17(3), 295-304.
- O'Hanlon, K. (2015) How to Manipulate Plasmid Copy Number. Bitesize Bio. Recuperado de: <https://bitesizebio.com/22824/how-to-manipulate-plasmid-copy-number/>.
- Organización Mundial de la Salud (2014). *Global status report on alcohol and health, 2014*. Ginebra, Suiza: Prensa OMS.
- Papke, D., & Grosman, C. (2014). The role of intracellular linkers in gating and desensitization of human pentameric ligand-gated ion channels. *J Neurosci*, 34(21), 7238-7252.
- Petrat, F., Boengler, K., Schulz, R., & de Groot, H. (2012). Glycine, a simple physiological compound protecting by yet puzzling mechanism(s) against ischaemia-reperfusion injury: current knowledge. *Br J Pharmacol*, 165(7), 2059-72.
- Qu, Y., Liu, Y., Noor, A. F., Tran, J., & Li, R. (2019). Characteristics and advantages of adeno-associated virus vector-mediated gene therapy for neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res*, 14(6), 931.

- Russo, S. J., & Nestler, E. J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat Rev Neurosci*, 14(9), 609-25.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual (2da edición). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schoch, S., Cibelli, G., & Thiel, G. (1996). Neuron-specific gene expression of synapsin I major role of a negative regulatory mechanism. *J Biol Chem*, 271(6), 3317-3323.
- Söderpalm, B., & Ericson, M. (2011). Neurocircuitry Involved in the Development of Alcohol Addiction: The Dopamine System and its Access Points. In: Sommer, W., & Spanagel, R. (eds) *Behavioral Neurobiology of Alcohol Addiction*. Current Topics in Behavioral Neurosciences, vol 13. Springer Berlin, Heidelberg.
- Söderpalm, B., Löf, E., & Ericson, M. (2009). Mechanistic studies of ethanol's interaction with the mesolimbic dopamine reward system. *Pharmacopsychiatry*, 42(S 01), S87-S94.
- Söderpalm, B., Lidö, H. H., & Ericson, M. (2017). The Glycine Receptor—A Functionally Important Primary Brain Target of Ethanol. *Alcohol Clin Exp Res*, 41(11), 1816-30.
- Soyka, M., & Müller, C. A. (2017). Pharmacotherapy of alcoholism—an update on approved and off-label medications. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 18(12), 1187-99.
- Spanagel, R. (2009). Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior. *Physiological reviews*, 89(2), 649-705.
- Summers, D. K. (1996). The biology of plasmids. Blackwell Science Ltd.
- Suzdak, P. D., Schwartz, R. D., Skolnick, P., & Paul, S. M. (1986). Ethanol stimulates gamma-aminobutyric acid receptor-mediated chloride transport in rat brain synaptoneuroosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(11), 4071-5.
- Swift, R. M., & Aston, E. R. (2015). Pharmacotherapy for alcohol use disorder: current and emerging therapies. *Harvard review of psychiatry*, 23(2), 122.
- Thiel, G., Greengard, P., & Südhof, T. C. (1991). Characterization of tissue-specific transcription by the human synapsin I gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(8), 3431-5.
- Vandamme, C., Adjali, O., & Mingozi, F. (2017). Unraveling the complex story of immune responses to AAV vectors trial after trial. *Hum Gene Ther*, 28(11), 1061-1074.
- Walter, H. J., & Messing, R. O. (1999). Regulation of neuronal voltage-gated calcium channels by ethanol. *Neurochem Int*, 35(2), 95-101.
- Wood, W. N., Smith, K. D., Ream, J. A., & Lewis, L. K. (2017). Enhancing yields of low and single copy number plasmid DNAs from Escherichia coli cells. *J Microbiol Methods*, 133, 46-51.

Xu, J. Z., Zhang, J. L., & Zhang, W. G. (2018). Antisense RNA: the new favorite in genetic research. *J Zhejiang Univ Sci B*, 19(10), 739–749.

Yevenes, G. E., Peoples, R. W., Tapia, J. C., Parodi, J., Soto, X., Olate, J., & Aguayo, L. G. (2003). Modulation of glycine-activated ion channel function by G-protein betagamma subunits. *Nat Neurosci*, 6(8), 819-24.

Yevenes, G. E., Moraga-Cid, G., Guzmán, L., Haeger, S., Oliveira, L., Olate, J., ..., & Aguayo, L. G. (2006). Molecular determinants for G protein betagamma modulation of ionotropic glycine receptors. *J Biol Chem*, 281(51), 39300-7.

Yevenes, G. E., Moraga-Cid, G., Peoples, R. W., Schmalzing, G., & Aguayo, L. G. (2008). A selective G $\beta\gamma$ -linked intracellular mechanism for modulation of a ligand-gated ion channel by ethanol. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(51), 20523-8.

Zinn, E., & Vandenberghe, L. H. (2014). Adeno-associated virus: fit to serve. *Curr Opin Virol*, 8, 90-97.

11. ANEXOS

En los mapas de los plásmidos, se destacan los sitios únicos para enzimas de restricción.

Restriction map of pAAV-DIO-GlyRa1wt-mCitrine.xdna - 7495 nt
<Serial Cloner V2.5> -- <mié, 11 de mar. de 2020 15:06>

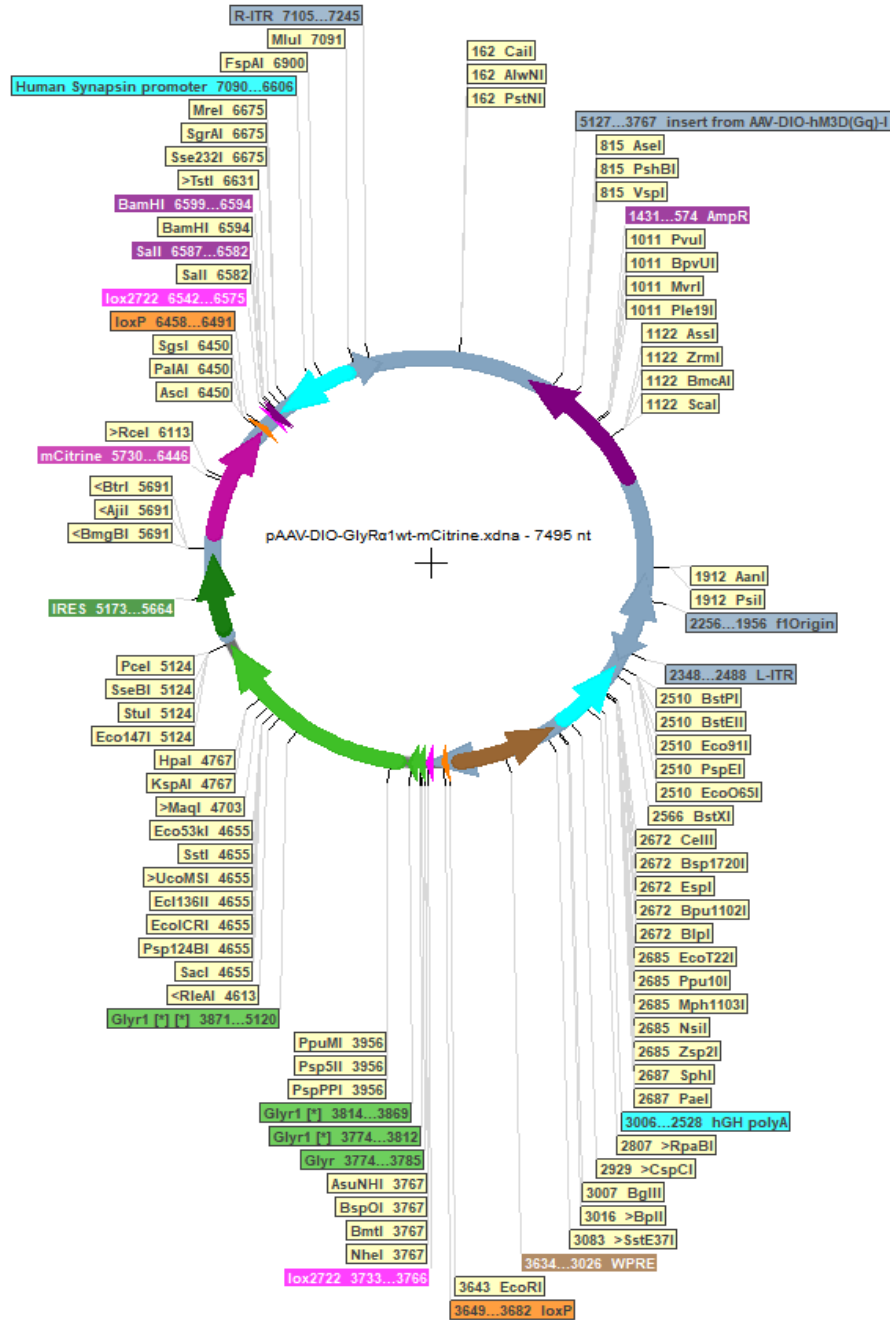


Figura A1. Esquema gráfico del plásmido pAAV-DIO-GlyRa1wt-mCitrine.

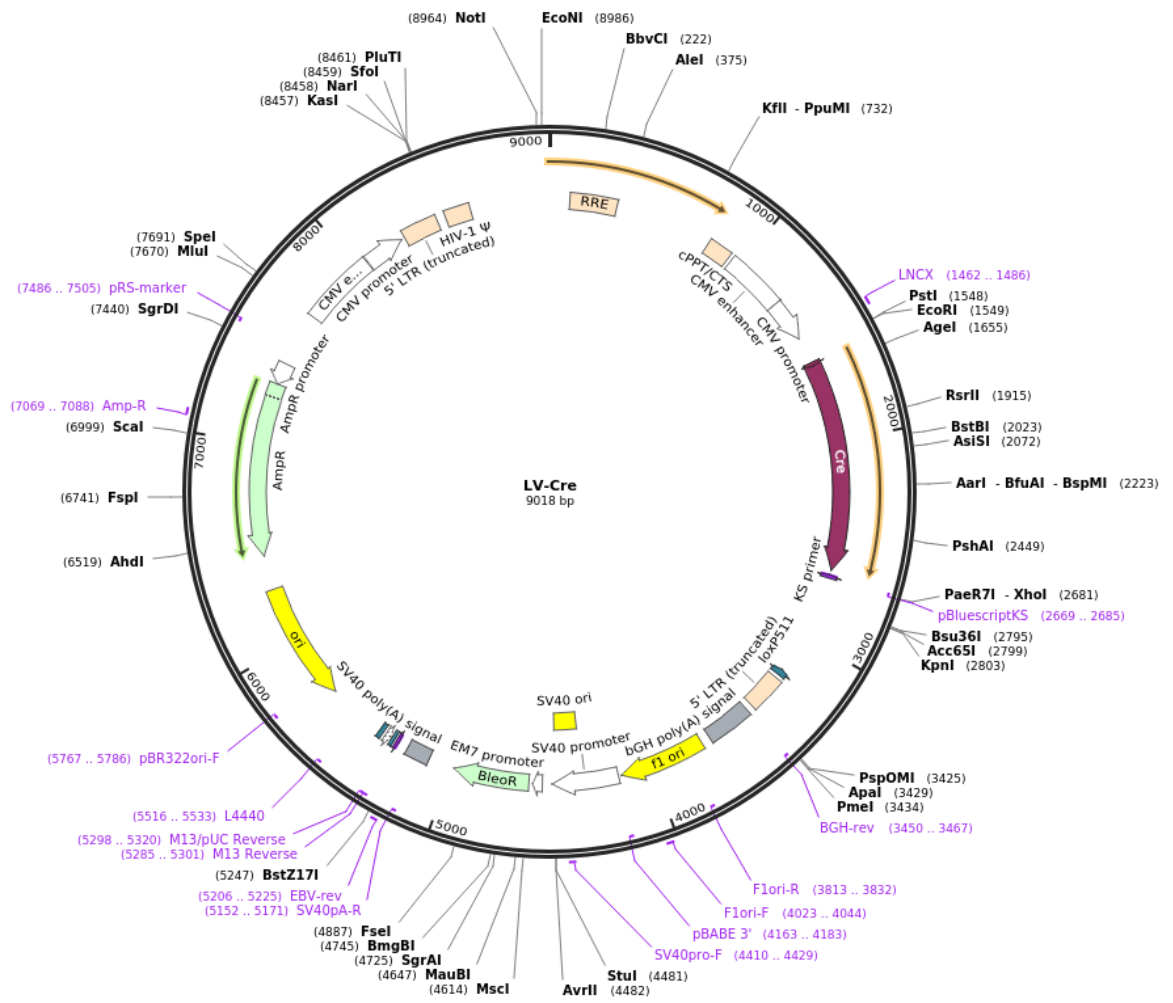


Figura A2. Esquema gráfico del plásmido pLV-Cre.

Restriction map of pAAV-MCS.xdna - 4650 nt
<Serial Cloner V2.5> -- <mié, 11 de mar. de 2020 18:24>

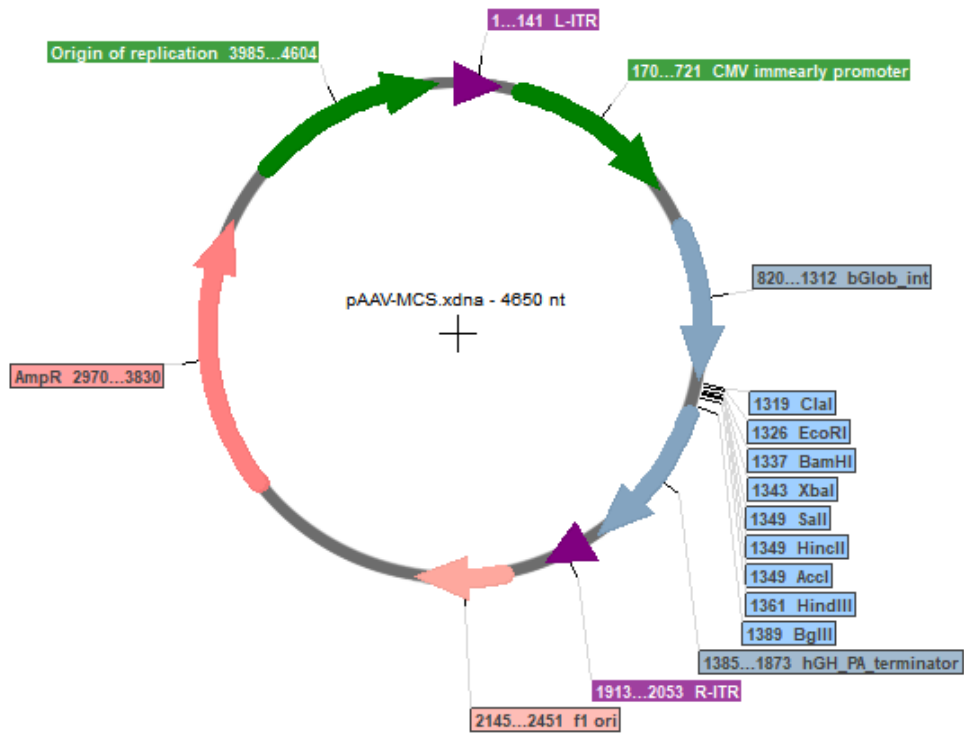


Figura A3. Esquema gráfico del plásmido pAAV-MCS.

Restriction map of Ligation pAAV-Cre.xdna - 5753 nt
 <Serial Cloner V2.5> -- <mié, 11 de mar. de 2020 16:50>

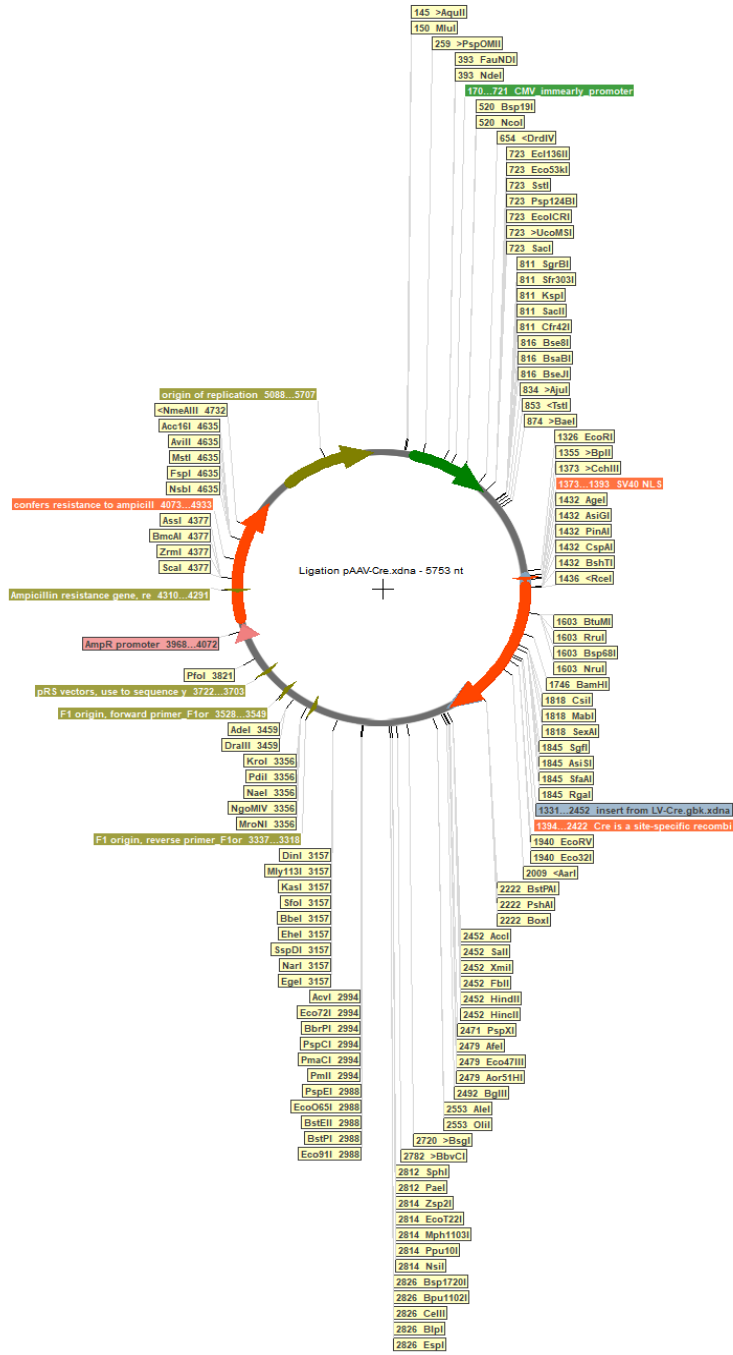


Figura A4. Esquema gráfico del plásmido pAAV-Cre.

Restriction map of pAAV-DIO-GlyR α 1mut-mCitrine.xdna - 7495 nt
 <Serial Cloner V2.5> -- <mié, 11 de mar. de 2020 17:26>

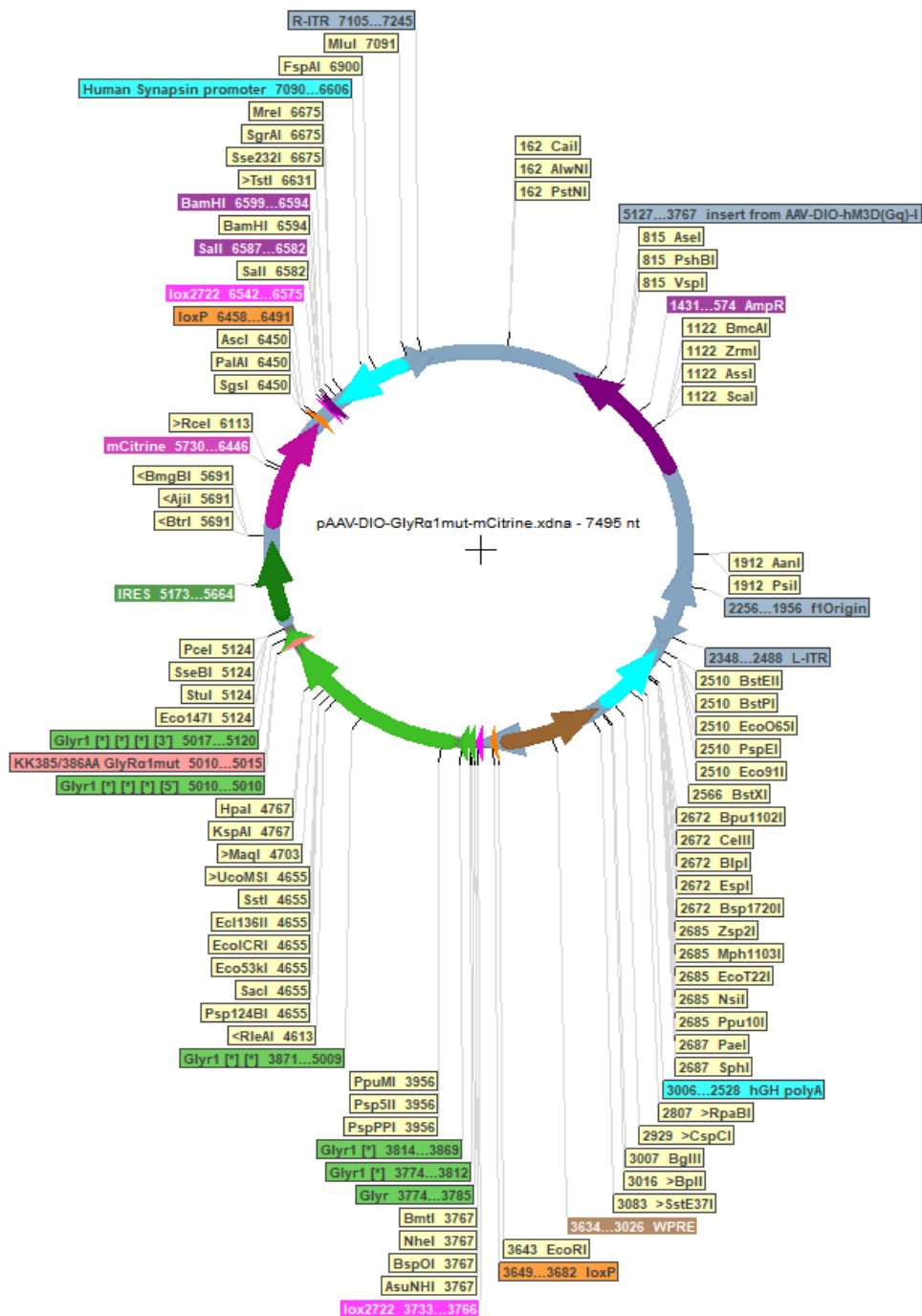


Figura A5. Esquema gráfico del plásmido pAAV-DIO-GlyR α 1mut-mCitrine.

Restriction map of pAAV-DIO-mCitrine (control).xdna - 6140 nt
 <Serial Cloner V2.5> -- <mié., 11 de mar. de 2020 14:57>

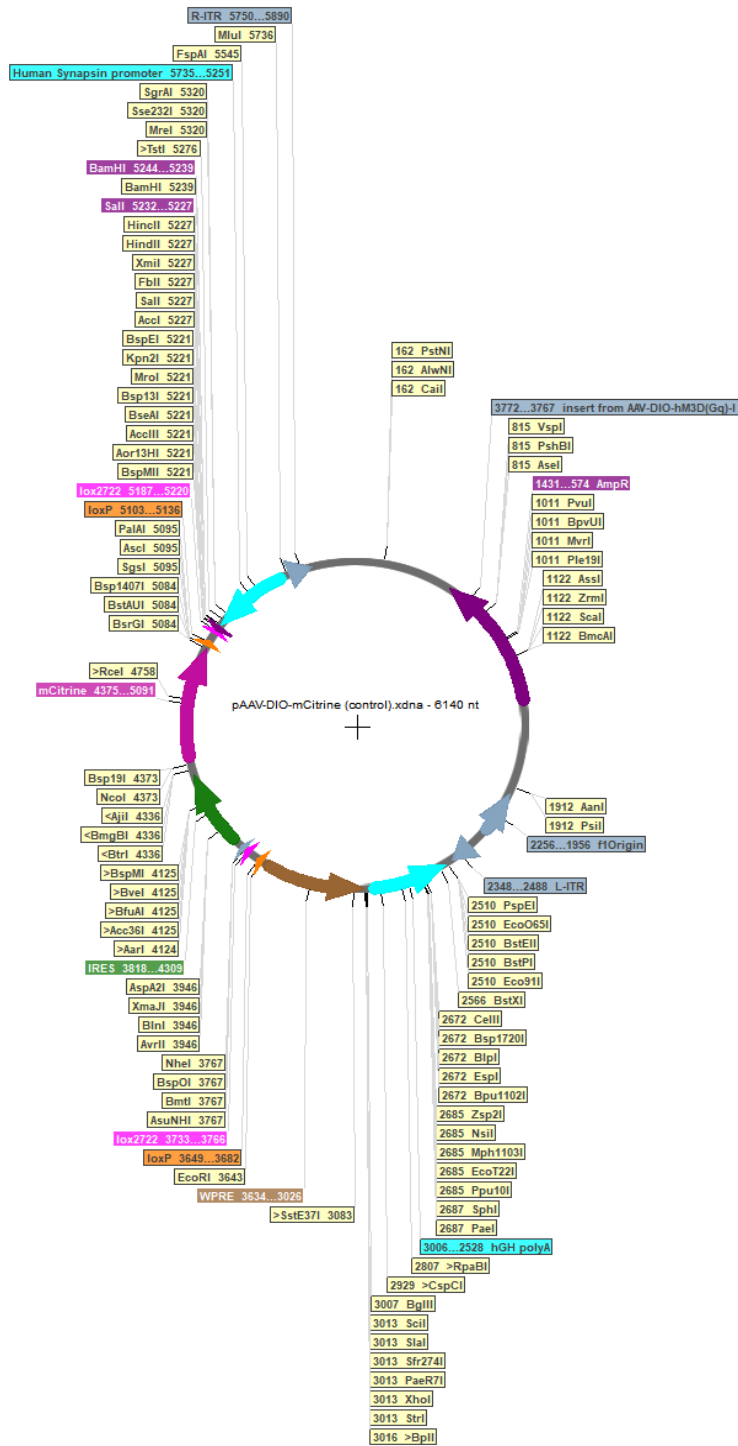


Figura A6. Esquema gráfico del plásmido pAAV-DIO-mCitrine.

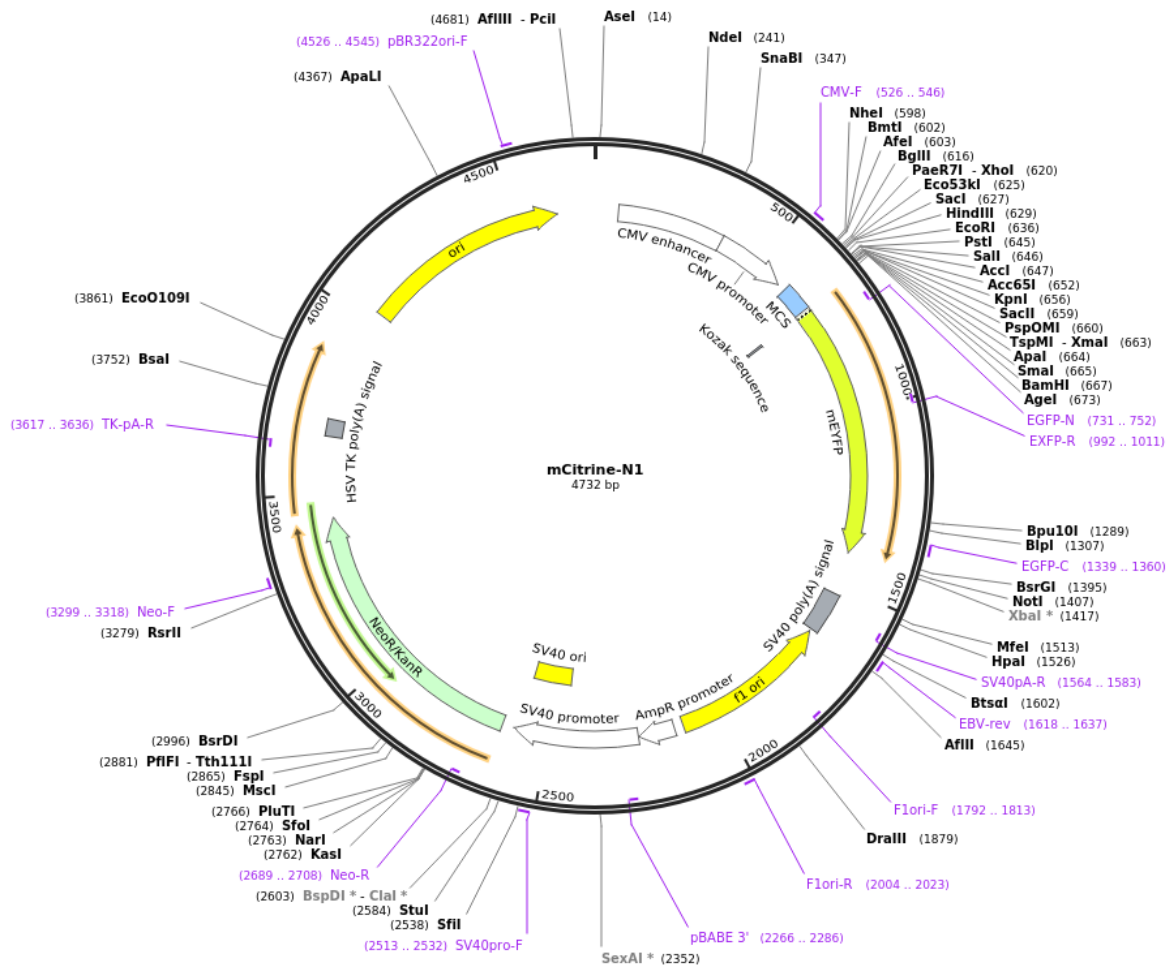


Figura A7. Esquema gráfico del plásmido pmCitrine-N1.