

## TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

# Caracterización bioquímica y estructural de complejos de receptores AMPA y subunidades auxiliares TARP tipo II

Biochemical and structural characterization of AMPA  
receptors and TARP type II complexes

Autora:

Irene Sánchez Valls

Directores:

Beatriz Herguedas Francés

Javier García Nafría

Instituto Universitario de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos

Departamento de Bioquímica y Biología Celular

Universidad de Zaragoza

2020/2021



## SIGLAS Y ABREVIATURAS

AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AMPAR	Receptores de AMPA
CKAMP	Cysteine-Knot AMPAR Modulatory Protein
CNQX	Cianquixalina (6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona)
CTD	Dominio carboxi-terminal intracelular
C-terminal	Carboxilo terminal
DDM	n-dodecil - $\beta$ -D-maltosido
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN codificante
ECR	Región extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ER	Retículo endoplasmático
FBS	Suero fetal bovino
GDN	Glico-diosgenina
GFP	Green Fluorescent Protein
GluA1-4	Subunidad (1-4) del receptor de AMPA
GluA4_pRK5	Vector pRK5 conteniendo la subunidad GluA4, con una etiqueta FLAG.
HRP	Peroxidasa de rábano picante
IVA	In Vivo Assembly
iGluR	Receptor de glutamato ionotrópico
LB	Medio de cultivo Laura-Bertani
LBD	Dominio de unión a ligando
mGluR	Receptor de glutamato metabotrópico
NMDA	N-metil-D-aspartato

NMDAR	Receptores de N-metil-D-aspartato
NTD	Dominio N-terminal
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEI	Poli(etil)enimina
PBP	Periplasmatic binding proteins
P/S	Penicilina/estreptomicina
RPM	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
SNC	Sistema nervioso central
SOB	Super optimal broth
TARP	Transmembrane AMPAR Regulatory Protein
TARP5	Isoforma $\gamma$ 5 de TARP de <i>Rattus norvegicus</i>
TARP5s	Isoforma $\gamma$ 5 del gen sintético de TARP
TARP7	Isoforma $\gamma$ 7 de TARP de <i>Rattus norvegicus</i>
TARP7s	Isoforma $\gamma$ 7 del gen sintético de TARP
TARP8	Isoforma $\gamma$ 8 de TARP de <i>Rattus norvegicus</i>
TARP_eGFP_pRK5	Vector pRK5 conteniendo TARP(5/5s/7/7s), fusionada a eGFP, con un sitio de corte para proteasas 3C entre ambas y una etiqueta de Histidinas detrás de la TARP

# ÍNDICE

1	RESUMEN.....	1
2	INTRODUCCIÓN .....	2
	<b>2.1 Sinapsis química.....</b>	<b>2</b>
	<b>2.2 Receptores sinápticos .....</b>	<b>3</b>
	2.1.1 Receptores metabotrópicos .....	4
	2.1.2 Receptores ionotrópicos .....	4
	<b>2.2 Receptores de AMPA (AMPA).....</b>	<b>7</b>
	2.2.1 Estructura AMPAR .....	7
	2.2.2 Edición del RNA .....	12
	2.2.3 <i>Splicing</i> alternativo .....	13
	<b>2.3 Subunidades auxiliares.....</b>	<b>14</b>
	2.3.1 TARP.....	15
	<b>2.4 Actualidad y futuras perspectivas .....</b>	<b>18</b>
3	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	20
4	MATERIALES Y METODOS: .....	21
	<b>4.1 Obtención de vectores para la expresión de TARP tipo II y GluA4 .....</b>	<b>21</b>
	4.1.1 Constructos de ADNc y clonajes.....	21
	4.1.2 Estrategia de clonaje .....	21
	4.1.3 Transformación.....	22
	4.1.4 Secuenciación .....	22
	4.1.5 Extracción de ADN plasmídico.....	23
	<b>4.2 Optimización de la producción de TARP tipo II y complejos AMPAR-TARP en células de mamífero.....</b>	<b>24</b>
	4.2.1 Líneas celulares.....	24
	4.2.2 Cultivo.....	24
	4.2.3 Ensayos de expresión en placa de 6 pocillos.....	24
	4.2.4 Producción de líneas estables .....	26
	4.2.5 Microscopía de fluorescencia.....	26
	<b>4.3 Purificación con resina TALON .....</b>	<b>26</b>
	<b>4.4 Producción y purificación de complejo AMPAR-TARP a media y gran escala.....</b>	<b>27</b>
	4.4.1 Co-transfección a media y gran escala .....	27
	4.4.2 Purificación a media escala mediante resinas anti-eGFP.....	28
	4.4.3 Purificación a gran escala .....	29

4.5	Tinción negativa y recogida de datos en microscopio electrónico.....	30
4.6	Procesamiento de los datos.....	31
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	32
5.1	Clonaje de TARP II en plásmidos de expresión de células de mamífero .....	32
5.2	Evaluación de la expresión de las subunidades auxiliares en células de mamífero .....	32
5.2.1	Optimización del agente de transfección y del tiempo de expresión en células de mamífero .....	32
5.2.2	Purificación de subunidades auxiliares y evaluación de la expresión entre genes procedentes de <i>Rattus norvegicus</i> y genes sintéticos .....	36
5.3	Obtención de líneas estables .....	38
5.4	Optimización de la obtención de complejo AMPAR-TARP .....	39
5.4.1	Comparación y evaluación de la formación de complejo AMPAR-TARP en HEK-Expi293F y líneas estables .....	39
5.5	Optimización de la producción y purificación de complejo AMPAR-TARP en células de mamífero.....	44
5.5.1	Purificación a media escala .....	44
5.5.2	Purificación a gran escala .....	46
5.6	Estudio estructural preliminar mediante microscopía electrónica de tinción negativa ....	49
5.7	Perspectivas y posibles modificaciones .....	52
6	CONCLUSIONES .....	54
7	BIBLIOGRAFÍA .....	56

# 1 RESUMEN

Los receptores de glutamato tipo AMPA (AMPA) son canales iónicos localizados en la sinapsis, donde juegan un papel fundamental en la neurotransmisión excitatoria y plasticidad neuronal. Los AMPAR son complejos tetraméricos ensamblados a partir de cuatro subunidades (GluA1-4), codificadas por diferentes genes (*GRIA-4*), en forma de dímero de dímeros. Los receptores AMPAR son impermeables a  $\text{Ca}^{2+}$  cuando contienen la subunidad GluA2, pero permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  cuando contienen combinaciones del resto de subunidades (GluA1, GluA3 y GluA4). Estos últimos pese a ser menos abundantes en el cerebro, tienen un papel importante en diversas situaciones patológicas (infarto cerebral o esclerosis lateral amiotrófica). Por otro lado, existen más de 30 subunidades auxiliares que interactúan con los AMPAR, aumentando su variabilidad estructural y funcional. Las TARP constituyen una de las familias más representativas de subunidades auxiliares y se pueden clasificar en tipo Ia, Ib y tipo II. Aunque se dispone de mucha información sobre la función, estructura y regulación de las TARP tipo I, las TARP tipo II han sido poco caracterizadas. En este trabajo se profundizó en la estructura entre los AMPAR permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  y las TARP tipo II, explorando la estabilización del complejo y su producción a gran escala en células de mamífero. La purificación del complejo permitió iniciar una caracterización estructural preliminar mediante microscopía electrónica de tinción negativa.

## ABSTRACT

AMPA-glutamate receptors (AMPA) are ion channels located in the synapse, where they play a critical role in excitatory neurotransmission and neuronal plasticity. AMPARs are tetrameric complexes, assembled from four subunits (GluA1-4) as a dimer of dimers. AMPA receptors are impermeable to  $\text{Ca}^{2+}$ . When containing the GluA2 subunits, AMPA receptors are impermeable to  $\text{Ca}^{2+}$  (CI-AMPARs) but combinations of the rest of the subunits (GluA1, GluA3 and GluA4) are permeable to  $\text{Ca}^{2+}$  (CP-AMPARs). Despite being less abundant in the brain, CP-AMPA play an important role in many pathological situations (stroke or amyotrophic lateral sclerosis). On the other hand, there are more than 30 auxiliary subunits that interact with AMPARs increasing their structural and functional variability. TARPs are one of the most representative families of auxiliary subunits and can be classified into type Ia, Ib and type II. Although much information is available about the function, structure and regulation of type I TARPs, type II TARPs have been poorly studied. In this work, we explored the structure of CP-AMPA in complex with type II TARPs. We optimized the stabilization of the desired complex and its large-scale production in mammalian cells. Purification of the complex allowed us to initiate a preliminary structural characterization by negative staining electron microscopy.

## 2 INTRODUCCIÓN

El cerebro humano contiene aproximadamente 100 mil millones de neuronas, cada una con capacidad de formar miles de contactos con otras células. Claramente, se requieren de mecanismos altamente sofisticados y eficientes para permitir la comunicación entre este alto número de elementos, lo cual se logra mediante el establecimiento de redes neuronales <sup>1</sup>.

La organización de las neuronas en redes es una de las características definitorias del sistema nervioso y resulta esencial para la conversión de un *input* sensorial a un *output* funcional. La interacción entre los elementos de la red es posible gracias a las sinapsis, que proporcionan un modo de transmisión de la información entre neuronas <sup>2</sup>. La neurona promedio forma varios miles de conexiones sinápticas y recibe un número similar. Aunque muchas de estas conexiones son altamente especializadas, todas las neuronas utilizan una de las dos formas básicas de transmisión: eléctrica o química.

Las sinapsis eléctricas se emplean principalmente para enviar señales despolarizantes rápidas <sup>3</sup>. Este tipo de sinapsis permite el flujo directo y pasivo de corriente eléctrica desde una neurona a otra a través de canales formados por conexinas (uniones *gap*), que conectan ambas células <sup>3</sup>. Por el contrario, las sinapsis químicas permiten la comunicación de célula a célula a través de la secreción de neurotransmisores <sup>4</sup>. Los agentes químicos liberados por las neuronas presinápticas producen un flujo de corriente secundario en las neuronas postsinápticas mediante activación de receptores específicos. Este segundo tipo de sinapsis permite una señalización más variable y puede producir comportamientos más complejos.

### 2.1 Sinapsis química

La neurotransmisión química es el principal medio por el cual las neuronas se comunican entre sí en el sistema nervioso de los mamíferos. Los eventos presinápticos y postsinápticos están altamente regulados y se caracterizan por: (1) formación de vesículas encargadas de almacenar y transportar el neurotransmisor desde el cuerpo celular hasta el terminal axónico, (2) presencia de un terminal presináptico con una membrana activa, (3) liberación de neurotransmisores que transmiten la señal y (4) una membrana postsináptica compuesta por varios tipos de receptores <sup>5</sup>.



Los *input* excitatorios resultan en un flujo de cationes cargados positivamente, que dan lugar a la despolarización de la membrana plasmática. En el terminal presináptico, la despolarización de la membrana activa canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, lo que permite la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  <sup>6</sup>. El aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  moviliza las vesículas contenedoras de neurotransmisores, las cuales se fusionan con sitios específicos de la membrana presináptica <sup>7</sup>.

Entre ambas membranas (la presináptica y la postsináptica), se encuentra la hendidura sináptica, espacio extracelular entre el final de una neurona y el inicio de la siguiente, sobre el que se libera el neurotransmisor químico. Éste difunde a través de la hendidura hasta la neurona postsináptica, activando al receptor correspondiente y propagando la señal <sup>5</sup>. Debido a esto, el retraso sináptico, tiempo requerido para que la membrana presináptica libere el neurotransmisor, difunda a través de la hendidura sináptica y se una al receptor, es, aproximadamente, de 0.5 a 1.0 ms.

Los receptores excitados pueden activar procesos de señalización posteriores, iniciando flujos iónicos, que dan lugar a alteraciones del potencial eléctrico transmembrana. Estos cambios se propagan al cuerpo celular y cono axónico, pudiendo iniciarse un potencial de acción en la neurona postsináptica <sup>6</sup>.

El tipo de neurotransmisor liberado desde el terminal presináptico y el tipo de receptor específico correspondiente en el terminal postsináptico es crítico en la determinación de la calidad e intensidad de información transmitida <sup>5</sup>. Además, la suma temporal y espacial juega un papel fundamental en la regulación de la transmisión neuronal, filtrando e integrando eventos sinápticos de un rango de amplitud y duración variados <sup>8</sup>.

## 2.2 Receptores sinápticos

En función del tipo de respuesta causada por la unión del neurotransmisor a su receptor, los receptores sinápticos se clasifican como receptores ionotrópicos y metabotrópicos. La unión del neurotransmisor tiene lugar en la cara exterior de la membrana y la señal producida por el evento de reconocimiento se transfiere a la neurona por un cambio conformación en la proteína del receptor. Sin embargo, el efecto de la señal puede ser directo, por apertura de

un canal iónico (receptores ionotrópicos), o indirecto, mediante la activación de un complejo asociado a proteínas G (receptores metabotrópicos).

#### 2.1.1 Receptores metabotrópicos

La primera familia de receptores de neurotransmisores son los receptores metabotrópicos, llamados así porque el movimiento de iones a través de canales de membrana depende de uno o más pasos metabólicos. Estos receptores no tienen canales iónicos como parte de su estructura; en cambio, modulan el paso de iones mediante la activación de moléculas intermedias efectoras: proteínas G <sup>9</sup>. Por esta razón, los receptores metabotrópicos también se denominan receptores acoplados a proteínas G.

Debido a que se requieren varios pasos moleculares intermediarios para pasar de la proteína receptora al efector final, la modulación del estado eléctrico de la neurona postsináptica es lenta y compleja <sup>9</sup>.

#### 2.1.2 Receptores ionotrópicos

Los receptores ionotrópicos unen moléculas de neurotransmisor y son canales iónicos directamente capaces de cambiar el estado eléctrico de la neurona postsináptica mediante flujo de iones a través de la membrana.

Estos receptores decodifican señales químicas en respuestas eléctricas, transmitiendo la información desde una neurona a otra. El tiempo entre la unión del neurotransmisor al receptor y la apertura del poro iónico es del orden de microsegundos a milisegundos. Por tanto, en las sinapsis mediadas por receptores ionotrópicos, el tiempo entre el potencial de acción de despolarización del axón y el inicio de la corriente de flujo de iones a través del receptor es de 1 a 2 milisegundos <sup>10</sup>. Este tipo de transmisión sináptica produce una influencia rápida y fuerte en la neurona postsináptica.

En el sistema nervioso central (SNC), la rápida transmisión mediada por receptores ionotrópicos tiene dos principales efectos: la excitación neuronal o la inhibición, dependiendo de si el efecto neto favorece (o no) que la neurona postsináptica genere un potencial de acción.

La transmisión sináptica excitatoria rápida está mediada, principalmente, por receptores ionotrópicos con poros permeables a iones cargados positivamente. La activación del

receptor resulta en la entrada de Na<sup>+</sup> a la célula dando lugar a la despolarización del potencial de membrana, aproximándose al potencial de acción umbral.

La transmisión sináptica inhibitoria rápida, sin embargo, está mediada por receptores con canales permeables a iones cargados negativamente, como el cloruro. Una vez activados, los receptores hiperpolarizan el potencial de membrana y fijan el potencial de membrana a voltajes por debajo del potencial de acción umbral.

Algunos ejemplos de los neurotransmisores más conocidos y sus receptores específicos se incluyen en la **Tabla 2.1**.

Neurotransmisor	¿Receptor ionotrópico?	¿Receptor metabotrópico?
<b>Aminoácidos</b>		
GABA	Sí (inhibitorio)	Sí
Glutamato	Sí (excitatorio)	Sí
Glicina	Sí (inhibitorio)	
<b>Aminas biogénicas</b>		
Dopamina		Sí
Norepinefrina		Sí
Epinefrina		Sí
Serotonina	Sí (excitatorio)	Sí
Histamina		Sí
<b>Purinérgicos</b>		
Adenosina		Sí
ATP	Sí (excitatorio)	Sí
<b>Acetilcolina</b>	Sí (excitatorio)	Sí
<b>Neuropéptidos</b>		Sí

**Tabla 2.1.** Neurotransmisores químicos convencionales más conocidos y sus tipos de receptores. Entre paréntesis se indica si la respuesta que producen es excitatoria o inhibitoria.

Los receptores de glutamato son los receptores excitatorios más abundantes en el cerebro, responsables de mediar la gran mayoría de transmisiones en las redes neuronales. Tal y como se indica en la Tabla 1, existen receptores de glutamato metabotrópicos (mGluR) e

ionotrópicos (iGluR). Sin embargo, de aquí en adelante nos centraremos únicamente en los últimos, por su papel en este Trabajo de Fin de Máster.

Se han identificado diversos tipos de receptores de glutamato ionotrópicos, nombrados en función de los agonistas que los activan preferentemente: receptores de NMDA (N-metil-D-aspartato), receptores de AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazolpropiónico) y receptores de kainato (ácido 2-carboxi-3-carboximetil-4-isopropenilpirrilodina) <sup>11</sup>. Existe un cuarto subgrupo, los receptores  $\delta$ , que no se activan por glutamato, pero responden a la activación de mGluR. El progreso en la identificación de sus funciones y papel en la regulación sináptica, sin embargo, ha sido mucho más lento que para los otros iGluR <sup>12</sup>.

En general, todos los iGluR son canales iónicos que permiten la entrada de cationes tras la unión del glutamato. Los iGluR se ensamblan como tetrámeros compuestos de diferentes subunidades que presentan distintas propiedades fisiológicas y se distribuyen de manera diferencial en el SNC <sup>13</sup>. Cada una de las 4 subunidades que componen el canal comparten una estructura similar de dominios bien conservados incluyendo el amino-terminal extracelular (NTD), dominio de unión a ligando (LBD), dominio transmembrana (TMD) y el dominio intracelular carboxi-terminal (CTD) <sup>14</sup>. La unión del glutamato, o alguno de sus agonistas, al dominio LBD resulta en un cambio conformacional que modifica la conformación de las hélices transmembrana, abriendo un poro en la membrana y permitiendo el flujo de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y/o  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la misma.

Si bien algunas sinapsis glutamatérgicas presentan únicamente receptores de AMPA (AMPA) o NMDA (NMDAR), la mayoría cuenta con ambos tipos <sup>15</sup>. Los receptores AMPAR presentan cinéticas más rápidas que los NMDAR y son responsables del componente inicial rápido del potencial excitatorio postsináptico, permitiendo la entrada de  $\text{Na}^+$  <sup>16</sup>. Los NMDAR, en cambio, presentan más afinidad por el glutamato que los receptores de AMPA y son más permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  que a  $\text{Na}^+$ . La acción excitatoria del glutamato sobre los receptores de NMDA es muy sensible al potencial de membrana y se ha demostrado que  $\text{Mg}^{2+}$  es capaz de bloquear el flujo de corriente a través del receptor <sup>17</sup>. Cuando la célula alcanza potenciales ligeramente despolarizados (-30/-20 mV), gracias al componente inicial rápido de los AMPAR, el  $\text{Mg}^{2+}$  pierde afinidad por el NMDAR, permitiendo la unión de sus ligandos. Como resultado, los potenciales excitatorios pueden aumentar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la neurona

postsináptica, actuando como segundo mensajero y activando cascadas de señalización intracelulares posteriores <sup>15</sup>.

La estimulación prolongada de los iGluR puede resultar en el fenómeno conocido como excitotoxicidad, contribuyente principal a lesiones del sistema nervioso y síndromes neurodegenerativos <sup>18</sup>. A elevadas concentraciones, el glutamato actúa como una neurotoxina, conduciendo a un flujo de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  excesivo, que produce la hiperactivación aberrante de enzimas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , como caspasas y proteasas. Adicionalmente, los transportadores de glutamato, expresados en las células postsinápticas y encargados de retirar el glutamato de la hendidura sináptica, no son capaces de abordar el bombardeo de cationes causado por la sobreestimulación de iGluR, lo que deriva en apoptosis y el agravamiento de la enfermedad y su progresión <sup>14</sup>. Las neuronas motoras son especialmente vulnerables a la excitotoxicidad causada por los AMPAR.

## 2.2 Receptores de AMPA (AMPA)

Los receptores de AMPA son un subtipo de receptor ionotrópico de glutamato que modula la excitabilidad celular permitiendo el flujo de entrada de iones de sodio en la célula, tras unión de su agonista. Gracias a sus rápidas cinéticas en la escala de los sub-milisegundos, juegan un papel fundamental en la propagación de impulsos entre las células nerviosas, permitiendo una rápida despolarización de la membrana plasmática <sup>19</sup>. Los AMPAR experimentan, además, cambios durante la plasticidad sináptica, mecanismo por el cual las sinapsis se fortalecen o debilitan en respuesta a estímulos. Así, se producen tanto alteraciones en su número, como en la composición de subunidades, interacciones con proteínas adicionales o estado de fosforilación. Por tanto, identificar cómo los componentes básicos determinan la función del receptor en las sinapsis y analizar los mecanismos que controlan su biogénesis resulta clave en la comprensión de la transferencia y almacenamiento de la información en las redes neuronales.

### 2.2.1 Estructura AMPAR

Los AMPAR son complejos tetraméricos ensamblados a partir de cuatro subunidades idénticas (homoméricas) o similares (heteroméricas) en forma de dímero de dímeros (**Figura 2.1, A y B**). Estas cuatro subunidades AMPAR (GluA1-4) vienen codificadas por diferentes genes (*GRIA1-4*) y se diversifican aún más por mecanismos de *splicing* alternativo y edición de RNA

mensajero. Dado que cada subunidad difiere en su contribución a la cinética del canal, selectividad iónica y propiedades del receptor, la heteromerización aporta gran diversidad funcional <sup>19</sup>.

Cada subunidad de los AMPAR presenta la estructura modular de 4 dominios mencionada previamente: dominio amino-terminal (NTD) y dominio de unión a ligando (LBD), ambos de localización extracelular (región ECR), el dominio transmembrana (TMD), que forma el canal iónico, y el dominio carboxi-terminal (CTD).

*Dominio amino-terminal (NTD):* El dominio NTD supone casi la mitad del polipéptido (≈50% de la subunidad), abarcando los primeros 400 residuos de todas las subunidades del receptor en mamíferos <sup>20</sup>. Este dominio se pliega de forma bilobulada, en estructura de concha (**Figura 2.1, C**), y se extiende hasta la mitad de la hendidura sináptica, configurando una plataforma modular y flexible para la interacción proteica <sup>21</sup>. De los cuatro dominios, el NTD es el más diverso entre subunidades y presenta similitud de secuencia y estructural al dominio de unión de ligando extracelular del receptor de glutamato metabotrópico (mGluA1) y a varias proteínas periplasmáticas bacterianas de unión a aminoácidos. Esto sugiere un posible papel del NTD en la unión a ligandos endógenos o xenobióticos y en la regulación alostérica, tal y como se le atribuye al NTD de los NMDAR, identificando a este dominio como una posible diana farmacológica <sup>20</sup>. En particular, se ha descrito la interacción de N-cadherina con el NTD de GluA2, regulando la estabilidad sináptica, mientras que pentraxinas neuronales interactúan con el NTD de GluAs regulando el tráfico del receptor <sup>22</sup>.

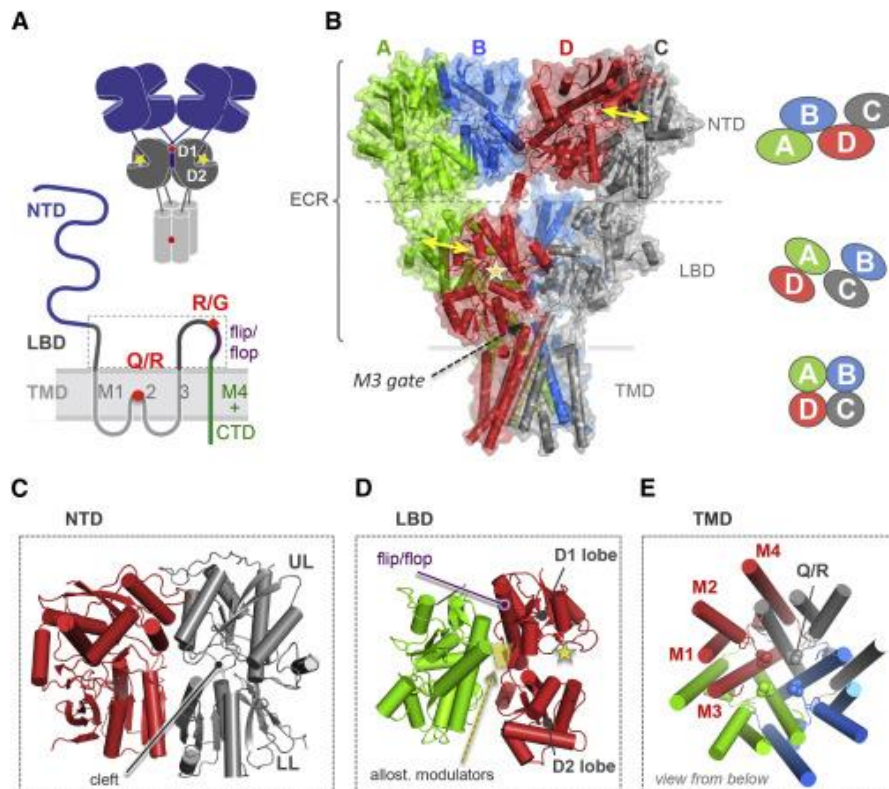
*Dominio de unión a ligando (LBD):* En la estructura primaria, el dominio LBD está dividido por los segmentos M1, M2 y M3 del TMD, en dos fragmentos, S1 y S2 (**Figura 2.1, D**) <sup>23</sup>. LBD presenta una estructura bilobulada y pertenece a la superfamilia de las proteínas de unión periplasmáticas (PBP), que capturan el ligando en una hendidura interlobular, lo cual desencadena el cierre de la estructura en forma de concha <sup>19</sup>. Los lóbulos superiores de los LBDs de subunidades adyacentes dimerizan espalda con espalda, de manera que el cierre de la “concha” alrededor del glutamato causa la separación de los lóbulos inferiores, transmitiendo así la fuerza mecánica para abrir la puerta del canal.

*Dominio transmembrana (TMD):* El dominio TMD se pliega en una estructura bilobulada, en la que se diferencian tres segmentos hidrofóbicos (TM1, TM3 y TM4) y un bucle de re-entrada (TM2) <sup>24</sup>, que forma una constricción en la base del poro del canal (**Figura 2.1, E**). La puerta del canal, la región más conservada del iGluA, está formada por el cruce de las cuatro hélices M3 y restringe el poro en la zona extracelular. Las hélices M3 están conectadas mediante *linkers* al dominio LBD, modulando la función de agonistas y las cinéticas de desensibilización <sup>19</sup>.

*Dominio carboxi-terminal (CTD):* El dominio CTD varía en longitud entre subunidades y variantes de *splicing*. El empalme alternativo de los dominios C-terminales determina la unión de las subunidades a proteínas específicas, además de la regulación del receptor mediante fosforilación. Sin embargo, el desempeño de este dominio en el tráfico del receptor no se conoce con exactitud. Las regiones extracelulares y transmembrana de las distintas subunidades AMPAR son muy similares, pero varían en las colas intracelulares citoplasmáticas <sup>25</sup>.

El ensamblado final se dispone en forma de dímero de dímeros, con la región extracelular (ECR) abarcando la mayor parte del receptor (85% de su masa). El dominio NTD media la formación del dímero inicial, mientras que la tetramerización posterior (ensamblaje de dímeros) ocurre mediante interacciones entre los dominios LBD y TMD <sup>20</sup>. El ensamblaje ocurre en el retículo endoplasmático (ER) y, posteriormente, ligandos y chaperonas permiten un plegamiento eficiente y la exportación desde el ER hasta la superficie celular.

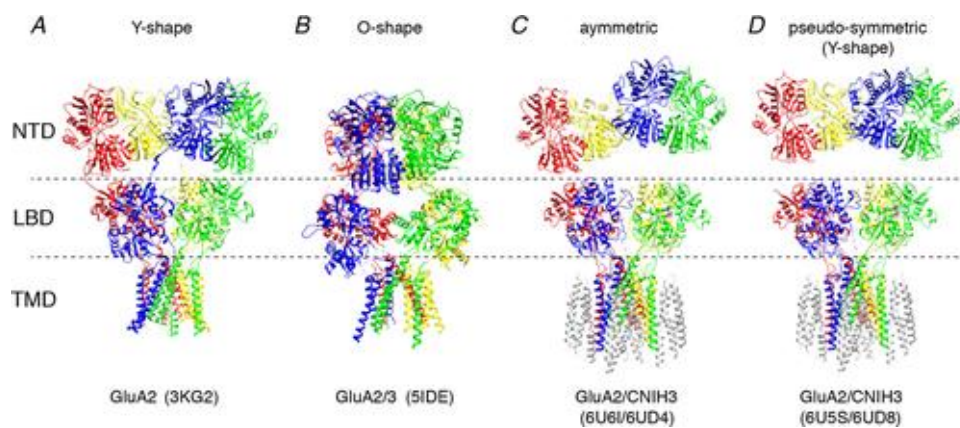
La característica estructural que distingue a los AMPAR de otros canales iónicos activados por ligando es el desajuste de simetría entre los dominios extracelulares y el TMD: mientras que NTD y LBD forman dímeros, el dominio TMD presenta estructura tetramérica (**Figura 2.1, C, D y E**) <sup>11</sup>. Las subunidades del AMPAR en un tetrámero se designan como A, B, C y D. Los dímeros NTD se forman entre las subunidades A/B y C/D, mientras que los dímeros LBD se forman entre A/D y B/C (**Figura 2.1, B**). En el dominio TMD, la superficie A/B es equivalente a la C/D. De igual forma, la superficie B/C es equivalente a la A/D.



**Figura 2.1. Topología y organización del tetrámero de AMPAR.** (A) Diagrama esquemático de los distintos dominios que conforman la cadena polipeptídica del monómero (abajo) y su representación en la estructura del tetrámero (arriba). El sitio de unión del agonista se indica con estrellas amarillas. (B) Estructura del homotetrámero de GluA2, con cada subunidad coloreada distintivamente. El sitio de unión del agonista se indica con una estrella amarilla, mientras que las flechas representan la dimerización de las subunidades en las distintas capas de dominios: mientras que en el NTD la dimerización es A/B y C/D, en el LBD es A/D y B/C. A la derecha del panel se muestra la visión superior de la disposición de las cadenas A, B, C y D en los distintos dominios. (C) Dímero del dominio NTD (UL, lóbulos superiores y LL lóbulos inferiores). (D) Dominio LBD, indicando el sitio de unión del agonista con una estrella. (E) Dominio transmembrana, indicando las hélices TM1-4 de cada cadena. *Figura obtenida de Greger et al (2017)*<sup>19</sup>.

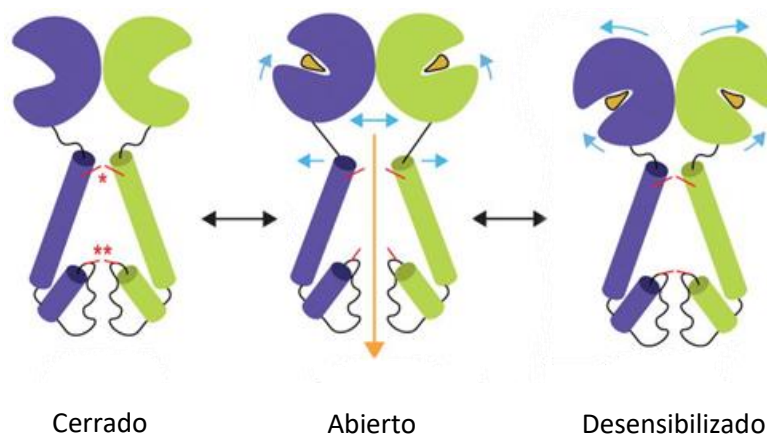
En la mayoría de los estudios estructurales, los receptores maduros presentan una organización de las subunidades que les otorga forma de “Y”. Sin embargo, la forma en “Y” canónica no es la única configuración (**Figura 2.2**). Por ejemplo, se han descrito arquitecturas globales asimétricas y una configuración más compacta en forma de “O”<sup>21</sup>. Estos cambios se introducen por pequeños giros de la capa NTD, respecto a la capa que conforma el LBD, sugiriendo que el dominio NTD de los AMPAR tiene suficiente capacidad de reorganización hacia conformaciones globales diferentes, modulando la apertura del canal<sup>23</sup>.





**Figura 2.2. Organizaciones de los tetrámeros de AMPAR.** El NTD y LBD aparecen conectados por un *linker* flexible, permitiendo distintos posicionamientos de la capa NTD. (A) Organización canónica en forma de “Y”. (B) Organización en forma de “O”. (C) Organización asimétrica de la capa NTD. (D) Organización pseudo-simétrica de la capa NTD. El espacio entre los dominios NTD y LBD es mucho mayor en D que en A. *Figura obtenida de Kamalova et al. (2020)*<sup>23</sup>.

Por otro lado, los diferentes estados funcionales del canal iónico se relacionan con distintos estados conformacionales de los AMPAR<sup>26</sup> (**Figura 2.3**).



**Figura 2.3. Distintos estados funcionales del canal iónico dan lugar a distintos estados conformacionales de los GluAs.** En la figura se muestra esquemáticamente la estructura de dos subunidades de GluA, con sus NTD omitidos (cada receptor contiene dos de estos dímeros). El receptor se encuentra en estado de reposo (desactivado), con las conchas del LBD abiertas por completo y desocupadas por el glutamato. Tras la unión del glutamato, las conchas se cierran, transmitiendo la tensión a los *linkers* LBD-TMD y permitiendo la apertura del canal iónico a un estado abierto (activado). Rápidamente, el glutamato se disocia del LBD, de manera que el receptor vuelve a su estado de reposo. Sin embargo, muchos receptores AMPAR transicionan a un estado desensibilizado, en el que el glutamato permanece unido de forma prolongada. En este estado, las interfaces LBD superiores se desestabilizan, y las conchas se cierran completamente hacia abajo, de manera que desaparece la tensión entre los *linkers* LBD-TMD. Como consecuencia, el canal iónico se cierra impidiendo la corriente de iones a través de la membrana. *Figura modificada de Twomey et al. (2017)*<sup>26</sup>.

El dominio LBD de los AMPAR responde a la unión de su agonista, glutamato, dando lugar a un cambio conformacional que permite la apertura de canales iónicos (activación). Después de la activación, el agonista puede disociarse del LBD, de forma que el receptor vuelve al estado de reposo (desactivado), o permanecer unido <sup>27</sup>. La unión prolongada del glutamato conduce a la desestabilización de la interfaz de los lóbulos superiores de los LBD de subunidades adyacentes, dando lugar al estado desensibilizado, con desacoplamiento de la hendidura del canal iónico <sup>28</sup>. Aunque no está claro qué es lo que determina el nivel de desensibilización en una sinapsis en particular, se valora la posible contribución de dos factores: la concentración de glutamato en la hendidura sináptica y las propiedades cinéticas de los AMPAR <sup>29</sup>.

### 2.2.2 Edición del RNA

La estequiometría y el ensamblaje del receptor de AMPA viene controlada por eventos de edición de RNA en dos sitios específicos: el sitio R-G en el dominio de LBD y el sitio Q-R en el bucle de re-entrada M2 del dominio TMD (**Figura 2.1, A**).

El cambio de arginina (R) por una glicina (G) en LBD altera las propiedades de ensamblaje del receptor. La forma no editada, con arginina, presenta un plegamiento de GluA2 y transporte a la membrana más eficientes. Esta modificación se produce en las subunidades GluA2, GluA3 y GluA4.

El cambio de una glutamina (Q) por una arginina (R) en el TMD (posición 586) ocurre con una eficiencia de casi el 100% en la subunidad GluA2 y es esencial para el desarrollo a la edad adulta. Dado que la arginina está cargada positivamente, este evento de edición del RNA altera drásticamente una característica crítica del receptor: las subunidades de GluA2 con sitios Q-R sin editar son permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que las subunidades de GluA2 editada son impermeables a  $\text{Ca}^{2+}$  <sup>30</sup>. La mayoría de los AMPAR contienen GluA2 editado, presentando baja permeabilidad al calcio (CI-AMPAR, impermeables a  $\text{Ca}^{2+}$ ), mientras que los que carecen de GluA2 (CP-AMPAR, permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ ) suponen una minoría significativa e importante con funciones clave en la señalización sináptica, plasticidad y enfermedad. Las subunidades GluA1, GluA3 y GluA4 no están editadas en esta posición de manera que todos los receptores compuestos por combinaciones de estas subunidades son permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ .

Estos sitios están ubicados dentro de interfaces de subunidades y afectan al ensamblaje del receptor favoreciendo la heterodimerización sobre la homodimerización, lo que explica por qué los receptores de AMPA que contienen GluA2 son, en su mayoría, heterómeros <sup>11</sup>. Esta baja permeabilidad a calcio de la mayoría de los receptores de AMPA nativos se atribuye al efecto dominante de la subunidad GluA2. De hecho, GluA1 y GluA3 no se asocian fácilmente en presencia de GluA2 y compiten por la formación de heterómeros. Sin embargo, el ensamblaje GluA1-GluA3 puede formarse hasta cierto punto cuando GluA2 está ausente <sup>31</sup>.

### 2.2.3 *Splicing* alternativo

Cada una de las cuatro subunidades del receptor de AMPA puede ser modificada post-transcripcionalmente por *splicing* alternativo en la región extracelular, generando dos variantes: flip y flop. El *cassette* flip/flop consiste en una secuencia de 115 pares de bases, de forma que el evento de *splicing* resulta en una diferencia, únicamente, de 9 a 11 aminoácidos, es decir, del ≈1% del contenido aminoacídico total <sup>32</sup>. Este *cassette* forma parte de la región extracelular del dominio LBD y su C-terminal precede el segmento TM4 del dominio TMD (**Figura 2.1, A**).

Dado que los AMPAR son ensamblajes heteroméricos de diferentes subunidades, los receptores pueden contener distintas isoformas flip/flop en su composición. El efecto específico de la variante en la función del receptor depende de la subunidad específica y la combinación de subunidades que conforman el ensamblaje final <sup>33</sup>. Para receptores homoméricos, se han descrito diferencias en el tráfico de los AMPAR atribuibles a la diferencia entre isoformas. En general, la isoforma flop se desensibiliza mucho más rápido que las formas flip, en respuesta al glutamato. Además, los canales flop responden menos a la ciclotiazida, agente bloqueante de la desensibilización. Estudios previos muestran que estas diferencias entre isoformas flip/flop son suficientes para impulsar el ensamblaje preferencial de receptores heteroméricos, favoreciendo las combinaciones flip/flop sobre receptores homoméricos flop <sup>31</sup>.

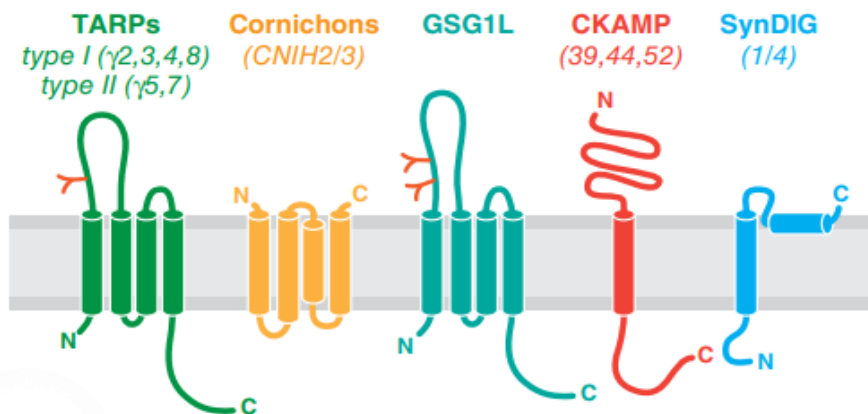
El dominio CTD es otra región susceptible a *splicing* alternativo. En función de la longitud de la cola C-terminal, se distinguen dos grupos de AMPAR: GluA1, GluA4 y una variante de *splicing* GluA2 (GluA2L) presentan una cola citoplasmática larga, mientras que GluA2, GluA3 y una variante de *splicing* de GluA4 (GluA4s) presentan una cola citoplasmática corta <sup>25</sup>. En general,

las subunidades con colas largas determinan el tráfico de los AMPAR cuando se ensamblan con otras subunidades de cola corta. Los receptores con subunidades de cola corta son movilizados de manera constitutiva desde el ER hasta la sinapsis, mientras que el tráfico de GluA2 y GluA3 se da en respuesta a actividad <sup>34</sup>.

### 2.3 Subunidades auxiliares

En el camino de los AMPAR desde el ER hasta la zona de densidad postsináptica de la neurona, los receptores interactúan temporalmente, ya sea directa o indirectamente, con varias proteínas, como chaperonas, estabilizadores, mediadores de liberación vesicular y proteínas de anclaje <sup>35</sup>. Una vez en la membrana postsináptica, los receptores no se encuentran aislados sino rodeados de una multitud de subunidades auxiliares.

Algunas de las principales subunidades auxiliares que interactúan con AMPAR son las proteínas reguladoras *Transmembrane AMPAR Regulatory Proteins* (TARP), *cornichons* (CNIHs), CKAMPs (CKAMP44, CKAMP39, CKAMP52, CKAMP59), SynDIG1 y SynDIG4<sup>36</sup> (**Figura 2.4**).



**Figura 2.4. Arquitectura de las distintas subunidades auxiliares de los AMPAR.**

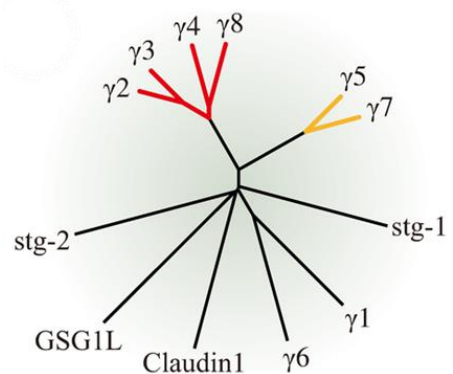
TARPs, cornichonas, GSG1L, cKAMP y SynDIG. Figura obtenida de Pinggera et al. (2020) <sup>35</sup>.

La fortaleza y estabilidad de la interacción entre las proteínas auxiliares y los AMPAR es variable <sup>37</sup>. Además, su expresión viene regulada tanto temporal, como espacialmente, lo que conduce a diferentes combinaciones en función de la edad, región cerebral, tipo neural e incluso localización celular. Por ejemplo, GluA2, TARP $\gamma 3$  and  $\gamma 8$ , CKAMP44 y CNIH2 son más abundantes en hipocampo, cortex y cuerpo estriado, pero menos en el cerebelo. Sin embargo, GluA4 y TARP  $\gamma 7$  muestran un perfil de expresión opuesto, con alta expresión en el cerebelo. Otras subunidades se expresan en regiones cerebrales muy restringidas, como CKAMP39 en las capas de células granulares del bulbo olfatorio y cerebelo. Por otro lado, las proteínas con

influencia en el tráfico del receptor, como PORCN, se localizan intracelularmente, mientras que las que juegan un papel en la apertura del canal iónico, como TARP, CNIHs o CKAMP44, se expresan en los complejos AMPAR en la superficie celular<sup>38</sup>.

### 2.3.1 TARP

Los miembros de la familia TARP pertenecen a la familia homóloga a la claudina y son proteínas transmembrana asociadas a receptores de AMPA, que se pueden clasificar en dos grupos: TARP tipo I canónicas ( $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ,  $\gamma 4$ , y  $\gamma 8$ ), que a su vez se diferencian entre TARP Ia ( $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ) y Ib ( $\gamma 4$ ,  $\gamma 8$ ), y TARP tipo II atípicas ( $\gamma 5$  y  $\gamma 7$ ).

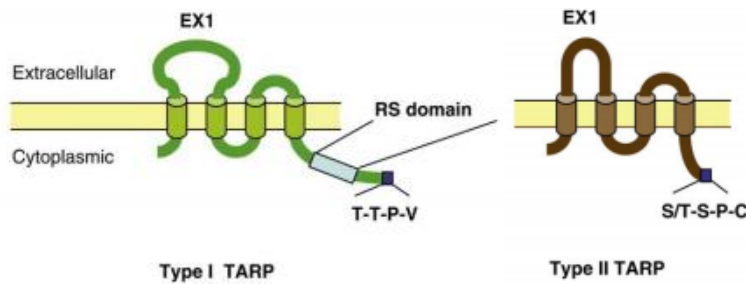


**Figura 2.5. Árbol filogenético de las subunidades auxiliares con 4 dominios transmembrana.** Las TARPs tipo II se encuentran separadas filogenéticamente de las TARPs tipo I. *Figura obtenida de Haering et al. (2014)<sup>34</sup>.*

Las proteínas TARP presentan distribuciones superpuestas en el cerebro, de manera que un tipo neuronal puede expresar varias isoformas de TARP. Sin embargo, no se ha descrito la asociación de dos isoformas diferentes de TARP al mismo complejo AMPAR-TARP<sup>39</sup>. Las TARPs tipo I se encuentran distribuidas por todo el cerebro y la pérdida de una TARP específica puede compensarse por otra TARP diferente de la misma subfamilia. Las TARPs de tipo II se localizan principalmente en el cerebelo, aunque  $\gamma 5$  también se expresa en algunas regiones del hipocampo y tálamo, y  $\gamma 7$  en el bulbo olfatorio, neocórtex, tálamo e hipocampo<sup>40</sup>.

#### 2.3.1.1 Estructura de las TARP y del complejo GluA-TARP

Estructuralmente, la topología de las TARP consiste en 4 hélices transmembrana (TM1-4) con el extremo N-terminal en el citoplasma, precediendo a TM1, y 2 bucles extracelulares (Ex1 y Ex2)<sup>41</sup> (**Figura 2.6**). La cola C-terminal citoplasmática se extiende desde TM4 y, en las TARPs tipo I canónicas, termina con un motivo de unión a dominios PDZ (-TTPV)<sup>23</sup>, que localiza a los receptores AMPAR en las sinapsis e interacciona con PSD-95. Las TARPs tipo II, en cambio, tienen un dominio de unión a PDZ atípico (-TSPC para  $\gamma 7$ , -SSPC para  $\gamma 5$ ), que se une de forma más débil a PSD-95<sup>23</sup>.



**Figura 2.6. Representación de los TARPs tipo I y TARPs tipo II.** TARPs tipo I presentan un dominio extracelular EX1 más largo y un dominio de unión a PDZ canónico. TARPs tipo II, sin embargo, tienen un dominio de unión a PDZ atípico. *Figura obtenida de Kato et al. (2010)*<sup>41</sup>.

Las proteínas TARP se unen preferencialmente a los receptores AMPAR tetraméricos. En la interacción, las TARP establecen interacciones con los segmentos TM1 y TM4 de las subunidades de GluA vecinas. Estas interacciones imponen cambios conformacionales en los dominios de la membrana, facilitando la apertura eficiente del canal tras unión del agonista que, a su vez, promueve interacciones entre Ex1 y Ex2 de TARP y el LBD del AMPAR, estabilizando el estado abierto<sup>42</sup>. Receptores con mutaciones localizadas en las superficies mencionadas presentan, por tanto, comportamientos de apertura del canal anormales.

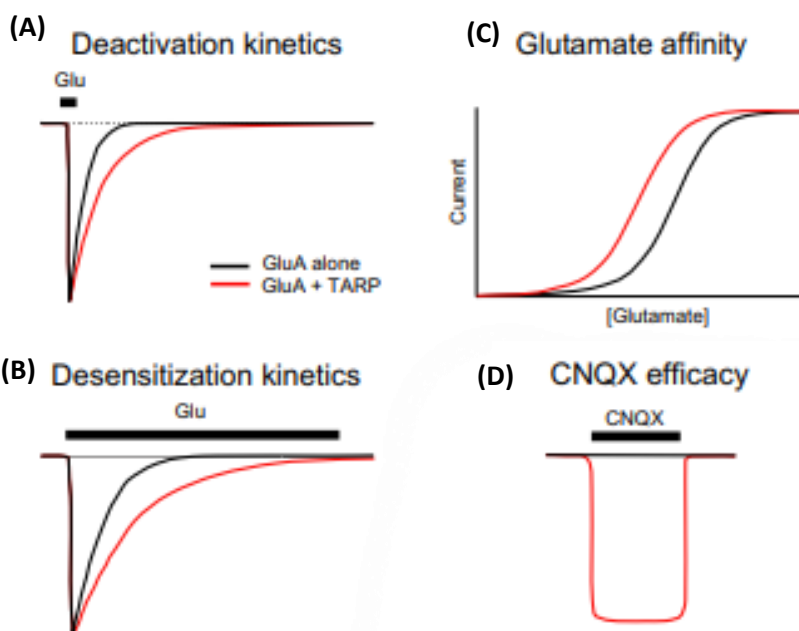
Sin embargo, el número de moléculas de TARP que se acoplan a un canal AMPAR individual no se conoce con exactitud. Parece que las TARP tipo Ib se asocian preferencialmente con el AMPAR en una estequiometría de 2:1 (2 subunidades TARP por tetrámero de receptor), especialmente en el hipocampo<sup>43</sup>, mientras que las TARP tipo Ia lo hacen en estequiometría 4:1. En relación, se ha descrito que, el fenómeno que se conoce como re-sensibilización es característico de complejos con estequiometría 4:1<sup>44</sup>. En la re-sensibilización el receptor de AMPA alcanza un estado inducido por TARP que se caracteriza por un aumento gradual de la corriente, después de una desensibilización inicial<sup>45</sup>. Para los receptores AMPAR asociados a TARP de tipo II no se ha especificado si tiene lugar el fenómeno de re-sensibilización, de manera que no se conoce con exactitud la estequiometría del complejo.

### 2.3.1.2 Papel funcional de las TARP

Para que un potencial de acción en la neurona presináptica inicie otro potencial en la célula postsináptica, se requiere una sinapsis excitatoria fuerte que sobrepase el potencial umbral. En este contexto, son varios los factores que intervienen en la fortaleza de la sinapsis, incluyendo el número de receptores en la membrana postsináptica, la afinidad del receptor por el glutamato y la localización en la membrana.

A nivel celular, las TARP aumentan los niveles de receptor en membrana y la afinidad por el glutamato, a excepción de TARP  $\gamma 5$ , que la disminuye en AMPAR que contienen GluA2. Por otro lado, los miembros de la familia TARP interactúan con quinasas de membrana favoreciendo la distribución de los AMPAR en agrupaciones de nanodominios <sup>46</sup>. Estos nanodominios se alinean con la zona de liberación de las vesículas presinápticas, formando nanocolumnas que aseguran la llegada de altas concentraciones de glutamato a la zona de anclaje del AMPAR <sup>47</sup>.

Por otro lado, las TARP cumplen una importante función de regulación de las propiedades electrofisiológicas de los AMPAR. La asociación de TARP tipo I con los receptores ralentiza el proceso de desactivación (**Figura 2.7, A**) y las cinéticas de desensibilización (**Figura 2.7, B**). Esto prolonga el intervalo de tiempo en el que el canal iónico permanece abierto, permitiendo la entrada de una mayor corriente a través de la membrana <sup>45</sup>. Esta subfamilia de las TARP también aumenta la afinidad del receptor por el ligando (**Figura 2.7, C**) y disminuye la concentración a la que el agonista es efectivo, aumentando así la probabilidad de apertura del canal <sup>48</sup>. Asimismo, se ha descrito que, en presencia de TARP, inhibidores de AMPAR, como CNQX, actúan como agonistas parciales (**Figura 2.7, D**) <sup>49</sup>.



**Figura 2.7. Modulación de la electrofisiología de los AMPAR por las TARPs.** Se compara la acción del GluA solo (negro) con la modulación del receptor en presencia de TARP tipo I (rojo). Se representan los cambios en cinéticas de desactivación (A), cinéticas de desensibilización (B), afinidad por el glutamato (C) y comportamiento del CNQX (D). *Figura modificada de Jackson et al. (2015)* <sup>46</sup>.

En cuanto a las TARP de tipo II, de forma similar a las de tipo I, éstas aumentan la conductividad del canal iónico de los AMPAR. Una característica distintiva de la TARP $\gamma$ 5 es su capacidad para reducir la probabilidad de apertura del canal en receptores de AMPA permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ . La  $\gamma$ 5 también produce un aumento de la conductividad del receptor, pero no se ha descrito que ejerza ningún cambio sobre el proceso de desensibilización. En cuanto a la TARP $\gamma$ 7, esta subunidad aumenta la conductividad de los receptores de AMPA y suprime el tráfico de receptores de AMPA impermeables a  $\text{Ca}^{2+}$ . Además, se ha descrito que, CNQX, que actúa como agonista parcial de AMPAR en presencia de TARP de tipo I, se mantiene como antagonista para aquellos receptores asociados a la subunidad  $\gamma$ 7.

## 2.4 Actualidad y futuras perspectivas

Tal y como se ha recopilado hasta aquí, los AMPAR constituyen un grupo heterogéneo de receptores, con alta diversidad tanto a nivel funcional como composicional y conformacional. Hasta la fecha, se han llevado a cabo múltiples estudios acerca de la estructura de receptores conteniendo la subunidad GluA2 en su composición. Sin embargo, la información disponible sobre los receptores permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ , sigue siendo escasa. Por esta razón, el objeto de estudio de este Trabajo de Fin de Máster fue el receptor AMPAR homotetramérico, compuesto por subunidades de GluA4, permeable a  $\text{Ca}^{2+}$ . Este receptor es predominante en el cerebelo, donde puede ensamblarse en forma de homotetrámero o formar un heterotetrámero con GluA1.

En cuanto a las subunidades auxiliares, si bien las TARP de tipo I se han estudiado ampliamente, apenas se ha prestado atención a las TARP de tipo II. La modulación de los AMPAR por parte de éstas puede ser más modesta que la de las TARP de tipo I, pero no deben pasarse por alto ya que tienen un impacto sustancial en la función del receptor. Al igual que el receptor GluA4, las TARP de tipo II son particularmente abundantes en el cerebelo.

Por otro lado, la disfunción de los receptores de AMPAR se asocia a varios síndromes neurológicos, incluyendo depresión, epilepsia, Alzheimer o Parkinson. Los fármacos diseñados están dirigidos a receptores AMPAR y son moduladores alostéricos positivos, que mejoran la cognición, o moduladores negativos, ensayados en tratamientos para la epilepsia<sup>50</sup>. En cualquier caso, estos moduladores están dirigidos a secuencias conservadas en el receptor: el LBD (moduladores positivos) y la región del canal iónico (moduladores negativos)<sup>38</sup>. Como



consecuencia, actúan sobre todos los AMPAR del cerebro indistintamente, dando lugar a efectos no deseados.

Recientemente, una de las nuevas estrategias propuestas para el tratamiento de la disfunción de los receptores AMPAR, que permite una actuación específica sobre los mismos, consiste en emplear como diana farmacológica las subunidades auxiliares. Para ello, es necesario tener un conocimiento exhaustivo de la estructura del complejo formado, que permita la búsqueda y optimización de moduladores alostéricos específicos.

### 3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Atendiendo al estado actual del conocimiento acerca de los receptores de AMPA y sus subunidades auxiliares, hipotetizamos que la caracterización de GluA4 en complejo con TARP tipo II permitirá sentar las bases estructurales de la interacción y definir el papel que éstas ejercen en la modulación del receptor. Además, este conocimiento podría contribuir al futuro desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas basadas en el abordaje del complejo AMPA-TARP.

Para constatar la hipótesis planteada, se definió como objetivo general del trabajo: Iniciar el estudio estructural de receptores AMPAR permeables a calcio en complejo con sus subunidades auxiliares TARP tipo II.

Para lograr el objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Clonar las TARP tipo II en plásmidos para expresión en células de mamífero.
2. Evaluar la expresión de los constructos generados células de mamífero.
3. Optimizar la formación y purificación de complejo AMPAR-TARP.
4. Llevar a cabo un estudio estructural preliminar mediante microscopía electrónica de tinción negativa.

## 4 MATERIALES Y METODOS:

### 4.1 Obtención de vectores para la expresión de TARP tipo II y GluA4

#### 4.1.1 Constructos de ADNc y clonajes

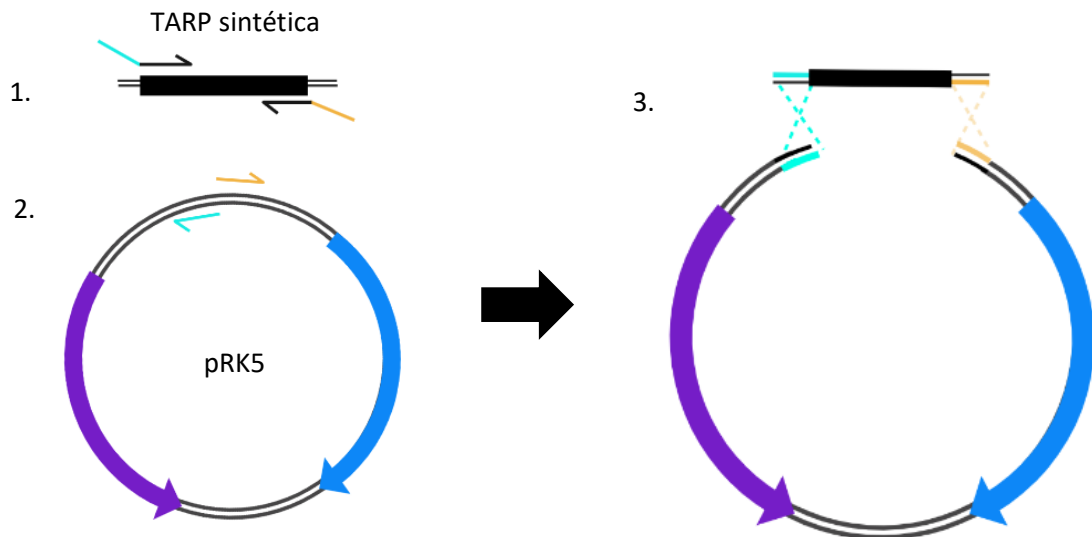
Los ADNc originales codificantes de GluA4 flip (*GRIA4*), TARP5 (*CACNG5*) y TARP7 (*CACNG7*), de *Rattus norvegicus*, estaban clonados en los plásmidos pRK5 (GluA4) y pIRES2\_eGFP (TARP5 y TARP7). Además, se encargaron los genes sintéticos (TARP5s y TARP7s) optimizados para la expresión en células de mamífero a la empresa Twist BioScience (secuencias incluidas en la Tabla Suplementaria S1).

El objetivo del clonaje fue generar constructos que incluyesen detrás del C-terminal de la TARP un sitio de reconocimiento de la proteasa 3C del rinovirus humano (LEVLFGP), un conector GGS, la eGFP y una etiqueta de Histidinas GGSHHHHHHH, con el fin de facilitar la visualización mediante fluorescencia, purificación por afinidad y evaluación de la expresión mediante Western Blot. Para el GluA4, el plásmido pRK5 original ya incluía una etiqueta FLAG después del primer residuo de proteína madura, adecuada para la purificación.

#### 4.1.2 Estrategia de clonaje

Todos los constructos se obtuvieron mediante *IVA cloning*<sup>51</sup>. Este tipo de clonaje no se basa en un ensamblaje enzimático, sino en el diseño de cebadores con zonas de homología entre sí. El sistema aprovecha la vía de recombinación bacteriana *in vivo* para el clonaje de los distintos elementos, con un paso de PCR <2h previo a la transformación. La PCR se llevó a cabo empelando la ADN polimerasa de Alta Fidelidad Phusion® (*New England Biolabs*), con 0.1 µM de cebadores, 1 ng de ADN molde y el siguiente protocolo: 30 segundos a 95 °C, 18 ciclos de 10 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C, 4 minutos a 72 °C y 5 minutos a 72 °C. La PCR permite obtener los fragmentos lineales, con las modificaciones de interés, y las regiones homólogas en los extremos de los fragmentos, gracias al diseño de los cebadores. Los cebadores se diseñaron empleando OligoCalc<sup>54</sup> y SnapGene® (listados en la Tabla Suplementaria S2) y se encargaron a ThermoFisher.

El posterior tratamiento con *Dpn1*, añadido al producto de PCR, permitió eliminar el ADN parental (37 °C durante 15 minutos). La enzima corta el ADN metilado, destruyendo selectivamente el ADN parental, pero no las nuevas secuencias sintetizadas.



**Figura 4.1. Representación esquemática de un clonaje mediante IVA cloning.** Para clonar un gen de un vector (1) a otro (2) se agregan secuencias homólogas a los pares de cebadores (región azul y naranja), de forma que una vez transformados en bacterias, se recombinan *in vivo*, generando el constructo de interés (3).

#### 4.1.3 Transformación

Los fragmentos lineales se transformaron en bacterias *Escherichia coli* XL10-Gold. Para ello se mezclaron 75 µl de células con 1 ng de ADNc. A continuación, se mantuvo la mezcla en hielo 5 minutos, se expuso a choque térmico (42 °C) durante 30 segundos y se volvió a conservar en hielo durante 2 minutos. Se añadieron 500 µl de medio SOB y, tras cultivo a 37 °C durante 1 hora, se plaqueó en LB-AGAR, añadiendo ampicilina (100 µg/ml).

#### 4.1.4 Secuenciación

Para comprobar la eficiencia de los clonajes, los constructos GluA4\_FLAG-pRK5, TARP5\_eGFP-pRK5, TARP5s\_eGFP-pRK5, TARP7\_eGFP-pRK5 y TARP7s\_eGFP-pRK5 se enviaron para secuenciar a la empresa MacroGen, empleando cebadores universales para SP6 y SV40.

#### 4.1.5 Extracción de ADN plasmídico

Para la obtención de los plásmidos TARP-eGFP\_pRK5 y GluA4-FLAG\_pRK5 se llevaron a cabo tanto MiniPrep y MaxiPrep, en función de la cantidad final de ADN deseada: hasta 20 µg o 850 µg, respectivamente.

Para la MiniPrep se seleccionaron las colonias de interés, previamente transformadas, y se cultivaron en LB-24 con ampicilina (100 µg/ml) en agitación a 37 °C durante 16 horas. El día de la extracción, el cultivo bacteriano se centrifugó a >8.000 rpm durante 3 min a temperatura ambiente (15-25 °C). El pellet bacteriano se resuspendió en 250 µl de tampón P1 (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNasaA) y se transfirió a un tubo de microcentrífuga, al que se le añadieron 250 µl de tampón P2 (200 mM NaOH, 1% SDS), mezclando por inversión del eppendorf 4-6 veces. A continuación, se añadieron 350 µl de tampón N3 (4,2 M Glu-HCl, 0,9 M acetato de potasio pH 4,8) y se mezcló invirtiendo el tubo de microcentrífuga. La mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 13.000 rpm y se transfirieron 800 µl del sobrenadante a una columna de centrifugación EconoSpin™. La columna se centrifugó 60 segundos a 13.000 rpm y se descartó el líquido que atravesó la columna. Para lavar la columna, se añadieron 750 µl de tampón PE (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 80% etanol) y se centrifugó durante 60 segundos a 13.000 rpm, eliminando el medio de lavado residual. Para eluir el ADN, se colocó la columna en un eppendorf limpio y se añadieron 50 µl de tampón EB (10 mM Tris HCl pH 8), dejando reposar durante 1 minuto. Por último, se centrifugó durante 1 min a 13.000 rpm y se conservaron las muestras a 4 °C. Para cuantificar y evaluar la pureza del ADN obtenido, se empleó NanoDrop, midiendo un volumen de muestra de 2 µl y tomando como referencia de blanco el tampón EB.

La MaxiPrep se realizó utilizando el Kit comercial *PureLink™ (Invitrogen™)*, siguiendo las indicaciones del mismo. Para cuantificar y evaluar la pureza del ADN obtenido, se empleó NanoDrop, midiendo un volumen de muestra de 2 µl y tomando como referencia de blanco el tampón EB.

## 4.2 Optimización de la producción de TARP tipo II y complejos AMPAR-TARP en células de mamífero

### 4.2.1 Líneas celulares

Se utilizaron HEK293T™ (*Thermo Fisher Scientific*) en cultivo adherente, para preparar placas de 6 pocillos y realizar pruebas preliminares de expresión.

Se emplearon HEK-Expi293F™ (*Thermo Fisher Scientific*) en suspensión para realizar ensayos de purificación a media y gran escala, ensayos en placa de 6 pocillos y la producción de líneas estables.

### 4.2.2 Cultivo

Las células HEK293T, mantenidas en DMEM (*Pan Biotech*) suplementado con 10% FBS y 1% de penicilina y estreptomina, se dividieron cada 3-4 días, con pases 1:5 o 1:7. En cada pase, se lavaba con PBS 1x (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), se les realizaba un tratamiento con tripsina (0,05% EDTA, 0,02% PBS, *Pan Biotech*) y se resuspendían en el volumen de DMEM adecuado en función de la dilución deseada.

Las células HEK-Expi293F™ se dividieron cada 2 días, tomando el volumen de cultivo y añadiendo la cantidad de medio *Free-Style F17™* (*Gibco*) suplementado con 2% de Glutamax (*Gibco*) para alcanzar una densidad final de 10<sup>6</sup> células/ml. Las células se mantuvieron en agitación a 130 rpm, 37 °C y 8 % de CO<sub>2</sub>.

### 4.2.3 Ensayos de expresión en placa de 6 pocillos

Para evaluar la expresión de TARP a partir los constructos preparados, así como optimizar las condiciones de transfección (PEI o PEI-max y la densidad de células óptima para la transfección), y estudiar la producción de complejo, comparando dos líneas celulares (HEK293T™ frente a las líneas estables), se realizaron ensayos de expresión en placas de 6 pocillos.

#### 4.2.3.1 Preparación placa de 6 pocillos

El día previo a la transfección, a cada pocillo se le añadió 1ml de poli-L-lisina y se retiró tras 5 minutos. A continuación, se realizó 1 lavado de los pocillos con PBS 1x y se añadieron 2,7 ml de DMEM completo a 37 °C. A cada pocillo, se le añadió el volumen de células adecuado para

que el día de la transfección se encontrasen a un 70-80% de confluencia (alrededor de 400.000 células para HEK-Expi293F™, y 250 µl de cultivo de HEK293T divididas 1/10 ese mismo día).

#### 4.2.3.2 Transfección en placa de 6 pocillos

Las células se transfectaron empleando PEI o PEI-max (1µg/µl) en un ratio 1:1.5 (ADN:PEI). Para la exploración de las subunidades auxiliares se emplearon 3µg de ADN, pero para el estudio del complejo AMPAR-TARP se ensayaron distintos ratios AMPAR:TARP.

Una vez preparada la mezcla ADN-PEI en 300 µl de medio DMEM sin FBS, se dejó reposar durante 15 minutos. La placa de 6 pocillos preparada el día anterior se puso a punto, sustituyendo el medio por DMEM fresco con 5% FBS a 37 °C y sobre éste se añadieron 300 µl de la mezcla PEI-ADN preparada previamente.

#### 4.2.3.3 Recuperación de las células y lisis celular

Las células se recogieron a 24 o 48 horas post-transfección. Para ello, se eliminó el medio de la placa de 6 pocillos y se lavó con 1 ml de PBS 1x. A continuación, se añadieron 1 ml de PBS y 10 µl de inhibidores de proteasas (100x) y se rascó el fondo de los pocillos con una espátula para recuperar todas las células. El medio celular se recogió y se centrifugaron las muestras a 13,000 rpm durante 10 minutos. Cada pellet se resuspendió en 250 µl de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, inhibidores de proteasas 1x, 0,5% DDM) y se incubó durante 1 hora en rotación a 4 °C.

#### 4.2.3.4 Electroforesis poliacrilamida SDS-PAGE y Western Blot

Las muestras lisadas se mezclaron con tampón de carga de electroforesis desnaturalizante y se cargaron en un gel de Tris-Glicina con un 12 % de poliacrilamida. La electroforesis se llevó a cabo durante 1,5 horas a voltaje constante de 150 V. Dado que el plásmido TARP-eGFP-\_RK5 contiene eGFP, se visualizó la fluorescencia de los geles mediante Alexa488 utilizando el sistema de imagen ChemiDoc™ MP (BioRad).

La transferencia se llevó a cabo utilizando el sistema *Trans-Blot Turbo™* (BioRad), programa BioRad Turbo 2 mini geles, durante 7 minutos, en solución de transferencia, con composición (v/v): 20% de tampón de transferencia (BioRad), 20% de etanol puro y 60% de agua MiliQ. La membrana se bloqueó con solución de bloqueo (BioRad, *Every Blot Blocking Buffer 12010020*) durante 5 minutos y se incubó con anticuerpo primario Anti-His Probe H3 HRP (Santacruz

*Biotechnology*) o Anti-eGFP de ratón diluido 1:1000 en solución de bloqueo (*Roche 11814460001*) y Anti-GluA4 de conejo diluido 1:2000 en solución de bloqueo (*EMD Milipore AB1508*) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron 3 lavados de la membrana con PBS-Tween 20 al 0,1% y se incubó con anticuerpos secundarios Anti-cadena ligera de ratón diluido 1:5000 (*EMD Milipore AP200AP*) y Anti-cadena ligera de conejo diluido 1:10000 (*EMD Milipore MAB201P*), conjugados con la peroxidasa de rábano (HRP) durante 40 minutos. Por último, se realizaron 3 lavados adicionales de la membrana y se empleó un sustrato quimioluminiscente para detectar la peroxidasa de rábano (HRP) (*Clarity™ Western ECL, BioRad*). Tras 5 minutos, las muestras se revelaron mediante quimioluminiscencia utilizando el sistema de imagen ChemiDoc™ MP.

#### 4.2.4 Producción de líneas estables

Se preparó una placa de 6 pocillos con células HEK-Expi293FTM, tal y como se ha detallado en el apartado **4.2.3.1** y se co-transfectaron 3 µg de los plásmidos de TARP y 0,5 µg del plásmido pCDNA3, que aporta resistencia a neomicina. Al día siguiente, se reemplazó el medio con medio nuevo conteniendo g418 a 0,4 mg/ml con el fin de seleccionar las células que hubiesen incorporado la resistencia a neomicina. Se realizaron cambios de medio hasta la muerte de las células y la aparición de colonias (2 semanas). Las colonias se picaron y se llevaron, primero a placas de 12 pocillos, posteriormente a placas de 6 pocillos, hasta llegar a *Flasks* de 25 cm<sup>2</sup>. Una vez obtenidas las líneas estables, se congelaron varias alícuotas en un 80% de FBS, 10% de DMSO (*Sigma*) y 10% de DMEM.

#### 4.2.5 Microscopía de fluorescencia

El microscopio Leica DMI600 se empleó para comprobar la expresión de la TARP mediante fluorescencia, tanto en las líneas estables producidas como en las placas de 6 pocillos transfectadas.

### 4.3 Purificación con resina TALON

Para (1) evaluar la expresión entre los genes procedentes de *R. norvegicus* y los sintéticos (TARP5 y TARP7 frente a TARP5s y TARP7s) y (2) comparar la extracción de complejo utilizando dos detergentes distintos (DDM y GDN), se llevaron a cabo distintos ensayos de purificación de complejo utilizando resina de afinidad de metales TALON (*Cytiva*), que se une a proteínas



que contienen etiquetas de poli-histidinas. Para ambos experimentos, se preparó una placa de 6 pocillos de forma equivalente a como se describe en el apartado **4.2.3.1**. La transfección de células HEK293T se llevó a cabo tal y como se detalla en el apartado **4.2.3.2**, empleando PEI-max y un ratio de AMPAR:TARP 1:1.

En ambos ensayos, las células se recogieron 48 horas post-transfección (*3.2.3.3 Recuperación de células y lisis celular*). El pellet se resuspendió en 250 µl de tampón de lisis con 0,5% DDM (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, inhibidores de proteasas 1x, 0,5% DDM) para el ensayo (1) y con 1% de DDM o GDN para el ensayo (2). En ambos casos, se incubó durante 45 min en rotación a 4 °C. A continuación, las células se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Para la purificación se emplearon 30 µl de resina TALON, previamente equilibrada mediante 3 lavados de 3 volúmenes de tampón de lavado (50 mM, Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,01% DDM/GDN). Sobre la resina se añadieron 200 µl del sobrenadante del lisado, recogiendo previamente una alícuota de 20 µl (Lisado), y se incubó en rotación durante 30 minutos a 4 °C. Seguidamente, se centrifugó a 4.000 rpm durante 5 minutos y, tras recoger 20 µl (Fracción no unida), se descartó el resto del sobrenadante para eliminar las proteínas que no se unieron a la resina. Se realizaron 3 lavados con 20 volúmenes de tampón de lavado, centrifugando a 1000 g durante 2 minutos en cada lavado y, tras recoger una alícuota de cada lavado (Lavados 1-3), se descartó el resto del sobrenadante. Para obtener la proteína, se llevó a cabo una elución con imidazol (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 0.01% DDM), centrifugando 1 minuto a 6000 g a 4 °C y recogiendo una alícuota de 20 µl (Elución).

Las alícuotas de Lisado, Fracción no unida, Lavados y Elución se evaluaron mediante electroforesis poliacrilamida SDS-PAGE y Western-Blot, tal y como se ha descrito en el apartado **4.2.3.4**.

## 4.4 Producción y purificación de complejo AMPAR-TARP a media y gran escala

### 4.4.1 Co-transfección a media y gran escala

Para la producción de complejo AMPAR-TARP a media y gran escala, se co-transfectaron los plásmidos GluA4-FLAG\_pRK5 y TARP-Egfp\_pRK5 en células HEK-Expi293F™ en suspensión, a una densidad de  $2.5 \cdot 10^6$  células/ml.

Para la co-transfección, se emplearon 1,1 mg de ADN totales total por litro de medio y 3 mg de PEI-max por litro de medio. La mezcla ADN-PEI-max se incubó 15 minutos a temperatura

ambiente en un volumen de medio FreeStyle F17, igual a 1/15 del volumen total del cultivo y posteriormente se añadió sobre el cultivo celular. Para las pruebas de producción a media escala, se emplearon volúmenes de cultivo transfectado de 8 ml con un ratio de ADN AMPAR:TARP de 1:1. Para la producción a gran escala, el volumen de cultivo transfectado fue de 1 L, con un ratio 2:1.

#### 4.4.2 Purificación a media escala mediante resinas anti-eGFP

El protocolo de purificación es similar al realizado con la resina TALON. En este caso, el tampón de lisis se preparó con GDN, detergente más suave que mantiene la estabilidad del complejo AMPAR-TARP, con composición 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, inhibidores de proteasas 1x y 0,5% GDN, y se incubó durante 1 hora en rotación a 4 °C. Para la purificación a media escala se emplearon 25 µl de resina de nanobody anti-eGFP (producida en el laboratorio), equilibrada en tampón de lavado conteniendo 0,015% de GDN. En este caso, la incubación de la resina con la muestra se mantuvo 1 hora en rotación a 4 °C y se realizaron los lavados pertinentes. Para obtener la proteína, se llevó a cabo una elución ácida, añadiendo 3 volúmenes de glicina pH 3.5 sobre la resina con la proteína unida. Se centrifugó 1 minuto a 13.000 rpm a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrífuga conteniendo 1/10 volúmenes de Tris 1M pH 8, del que se recogió una alícuota de 20 µl (Elución). Al pellet de resina se le añadieron 1/10 volúmenes de Tris 1M pH 8.

Las alícuotas de Lisado, Fracción no unida, Lavados y Elución se evaluaron mediante electroforesis poliacrilamida SDS-PAGE y Western-Blot, tal y como se ha descrito en el apartado **4.2.3.4**, para comprobar la eficiencia en la purificación del complejo GluA4\_TARP.

Debido a la elución ácida esta estrategia de purificación conduce a la desnaturalización del complejo AMPAR-TARP, pero permite evaluar la formación del mismo. Para la purificación del complejo en estado nativo mediante esta cromatografía de afinidad sería indispensable eluir la proteína mediante un tratamiento con la proteasa 3C, que llevaría a cabo la proteólisis en la proteína de fusión TARP-eGFP, dejando unida a la resina la eGFP y permitiendo así la elución del complejo AMPAR-TARP sin eGFP.

#### 4.4.3 Purificación a gran escala

##### 4.4.3.1 Purificación de afinidad mediante resina anti-FLAG

Una vez confirmada la formación del complejo mediante la purificación con la resina anti-eGFP se optó por purificar el complejo utilizando la resina anti-Flag (*anti-DYKDDDDK G1, L00432, Genscript*), que interacciona específicamente con la etiqueta Flag localizada en el N-terminal de la subunidad GluA4.

Las células se recogieron 48 horas post-transfección y se lisaron en frío, empleando un homogeneizador de tejido tipo "Dounce" y manteniéndose después en agitación durante 1,5 horas a 4°C. La lisis se realizó en 25 ml de tampón de lisis que contenía 0,5% de DDM (25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, inhibidores de proteasas 1x y 0,5% DDM). El material insoluble se eliminó mediante centrifugación (18.000 rpm, 30 min, rotor JA20) y el lisado se incubó con 250 µl de resina de afinidad anti-FLAG durante 1 hora. La resina fue previamente equilibrada realizando 3 lavados de 3 volúmenes con tampón de lavado conteniendo 0,015% GDN. La resina se lavó 4 veces, empleando en cada lavado los tampones de siguiente composición:

Lavado 1: 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 0,1% DDM.

Lavado 2: 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 0,05% GDN y 0,05% DDM.

Lavado 3: 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl y 0,1% GDN.

Lavado 4: 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl y 0,015% GDN.

De este modo se sustituyó el detergente utilizado en la lisis (DDM) por GDN, que mejora la estabilidad del complejo AMPAR-TARP.

La proteína se eluyó con 0.35 mg/ml de péptido 3xFLAG, recogiendo las eluciones (E1, E2, E3, E4, E5). Las alícuotas de Lisado, Fracción no unida, Lavados y Eluciones se evaluaron mediante Western-Blot, con las condiciones del apartado **4.2.3.4** para comprobar la eficiencia en la purificación del complejo GluA4\_TARP. Las fracciones que contenían el complejo se concentraron en un centrifón (*CORNING®*) con tamaño de poro de 100kDa mediante centrifugación a 13.000 rpm a 4°C. El centrifón fue previamente equilibrado con tampón de lavado a 4°C de composición 25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl y 0,015% GDN.

#### 4.4.3.2 Cromatografía de Exclusión Molecular

Tras la etapa de cromatografía de afinidad mediante la resina anti-FLAG, se llevó a cabo una etapa de cromatografía de exclusión molecular utilizando un FPLC AKTA Purifier equipado con una columna *Superdex 200 10/300 Increase*, que permite separar proteínas y complejos en función de su volumen hidrodinámico. Se inyectaron 250  $\mu\text{l}$  de muestra y el flujo utilizado fue de 0,75 ml/min. La columna se equilibró en tampón de lavado (25 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl y 0,015% GDN) y se recogieron fracciones de 1 ml.

Las fracciones que contenían proteína se concentraron mediante un centrífugo, tal y como se ha descrito en el apartado **4.4.3.1**.

#### 4.5 Tinción negativa y recogida de datos en microscopio electrónico

Las distintas fracciones concentradas de la filtración en gel se incubaron con 30  $\mu\text{M}$  NBQX, agonista de receptores de AMPA que atrapa el receptor en un estado cerrado. Para la preparación de rejillas de tinción negativa se emplearon rejillas de cobre recubiertas de una capa fina de carbono amorfo de 5-6nm (*TEM-CF400CU50, Sigma*). Antes de depositar la muestra sobre las rejillas, se llevó a cabo una descarga luminiscente de 60 segundos a 15 mA (Leica EM ACE200), que permite reducir la hidrofobicidad de la capa de carbono.

Se evaluaron dos soluciones de tinción negativa, NanoVan<sup>®</sup> y NanoW<sup>®</sup>, dado que previamente no se habían utilizado en el equipo de investigación, y se llevó a cabo la optimización de la preparación de las rejillas. En el protocolo final, se aplicaron 3  $\mu\text{l}$  de proteína sobre la rejilla tratada y, tras 50 segundos de incubación, se eliminó el exceso de líquido secando la gota con papel de filtro. Se realizaron 2 lavados de la rejilla con dos gotas de agua de 20  $\mu\text{l}$  y se secaron con papel de filtro. Posteriormente, se colocó la rejilla invertida sobre una gota de 5  $\mu\text{l}$  de NanoW<sup>®</sup> momentáneamente y se secó con papel de filtro. A continuación, la rejilla se volvió a colocar sobre una gota de 7  $\mu\text{l}$  de NanoW<sup>®</sup>, manteniéndolo durante 30 segundos. Por último, se secó la rejilla con papel de filtro.

Las rejillas se evaluaron mediante microscopía electrónica a temperatura ambiente, utilizando un microscopio T20 con un detector tipo CCD a una magnificación de 125,000x que resultó en un tamaño de pixel de 3,84  $\text{\AA}/\text{px}$ . Se recogieron 80 imágenes con un defoco de alrededor de 1  $\mu\text{m}$ , una exposición total de 1 s y una dosis aproximada de 20  $\text{e}^-/\text{\AA}^2$ .

## 4.6 Procesamiento de los datos

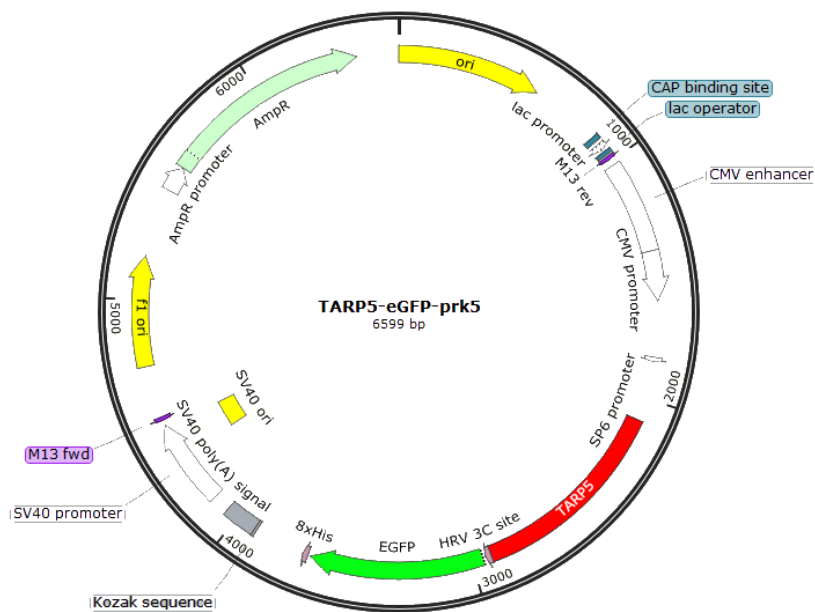
Las micrografías obtenidas con el microscopio electrónico se procesaron empleando Relion 3.1.<sup>52</sup> Tras importar las imágenes en formato *.tiff*, se procedió a la selección de las partículas. Para ello se empleó la función “Autopick” que permite al programa seleccionar automáticamente todas las partículas de las micrografías en función del diámetro aproximado de las mismas. Posteriormente, se evaluaron de forma individual las partículas de cada micrografía, limpiando la selección de “Autopick” y eliminando algunos artefactos que el programa había identificado como partículas. A continuación, se realizó una “extracción de las partículas” en una caja de 80 pixels (equivalente a 307 Å) mediante la función “Extract” y se iniciaron los pasos de promediado 2Ds, en los cuales se lleva a cabo una traslación, rotación y clasificación de las partículas que permite la evaluación preliminar del set de datos. Dado que no se observaron promediados 2Ds con características claras de AMPAR, no fue posible proceder a la etapa 3D para la construcción de un modelo tridimensional.

## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Clonaje de TARP II en plásmidos de expresión de células de mamífero

La secuenciación de los constructos preparados demostró que los clonajes realizados fueron satisfactorios. De esta forma, se logró clonar *CACNG5* (TARP5) y *CACNG7* (TARP7), desde pIRES2\_eGFP, e insertar los genes sintéticos (TARP5s y TARP7s), en pRK5 (resistencia a ampicilina), adecuado para la expresión en células de mamífero. Los constructos finales contenían un sitio 3C para proteasas, eGFP y una etiqueta de Histidinas, en el C-terminal de la TARP (**Figura 5.1**).

Los constructos obtenidos se nombraron como TARP5\_eGFP\_pRK5, TARP5s\_eGFP\_pRK5, TARP7\_eGFP\_pRK5, TARP7s\_eGFP\_pRK5.



**Figura 5.1.**

#### **TARP5-eGFP\_pRK5.**

El constructo final contiene un sitio de corte para proteasas 3C, eGFP (verde) y una cola de histidinas detrás de la TARP (rojo). Los constructos finales para TARP7, TARP7s y TARP5s son idénticos a este, pero con el gen en respectivo. *Plásmido visualizado con SnapViewer.*

### 5.2 Evaluación de la expresión de las subunidades auxiliares en células de mamífero

#### 5.2.1 Optimización del agente de transfección y del tiempo de expresión en células de mamífero

Para determinar las condiciones óptimas de transfección en estudios preliminares y poder posteriormente implantarlas para la producción de proteína a gran escala, se optimizó el proceso de transfección, evaluando el efecto entre el PEI y el PEI<sub>max</sub> sobre la transfección de

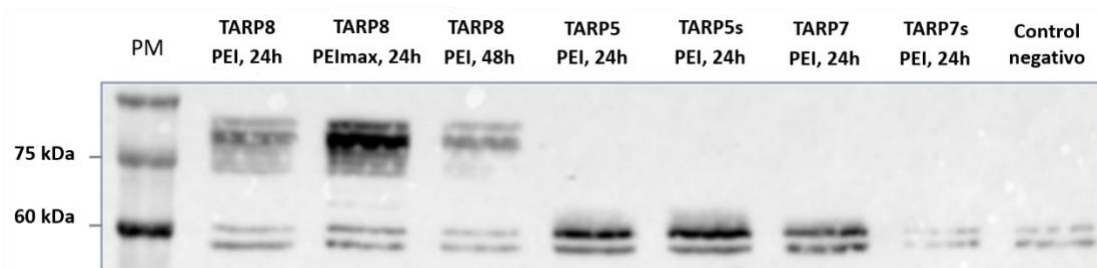
HEK293T 24 horas tras la preparación de la placa de 6 pocillos. Uno de los pocillos, sin embargo, presentó menor densidad celular (<70%) y aspecto poco confluyente pasadas las 24 horas, de manera que circunstancialmente se esperó otras 24 horas para realizar la transfección. Aunque esto no es lo más frecuente, se decidió evaluar este factor, comparando también la expresión de proteína entre la transfección 24h post preparación de la placa y 48h post preparación.

Se comprobó que todos los pocillos transfectados 24 horas post-preparación de la placa presentaran una confluencia, de forma aproximada, equivalente, mediante microscopía óptica. En este caso, dado que no se buscaba un control exhaustivo del número exacto de células transfectadas, no fue necesario utilizar un control de actina. Es importante recalcar que el objetivo del experimento consistió en buscar diferencias significativas de varios órdenes de magnitud en la expresión de proteína, estableciendo así un compromiso entre lo que cuesta obtener la proteína de interés y la cantidad obtenida, independientemente de que exista cierta variabilidad.

Se conoce que los medios de cultivo pueden impactar significativamente en la eficiencia de la transfección, debido a la presencia de algunos componentes como polímeros anti-agregación y agentes quelantes. Para evitar discrepancias entre los resultados, todos los pocillos de células HEK293T se mantuvieron en medio DMEM.

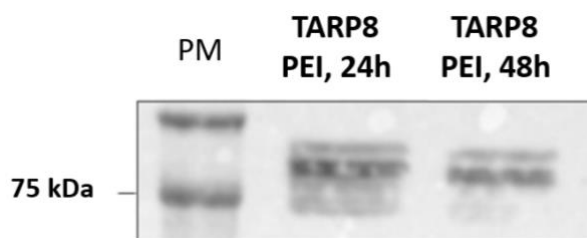
Mediante microscopía de fluorescencia se comprobó que las células habían incorporado el plásmido de interés. Todos los pocillos presentaban fluorescencia, indicativo de que las células expresaban eGFP, codificada en los plásmidos TARP-eGFP\_pRK5, y que, por tanto, la transfección había tenido lugar.

A continuación, se evaluó la expresión de proteína de interés, TARP tipo II, bajo las distintas condiciones mencionadas, mediante Western Blot empleando anticuerpo primario anti-GluA4 y anti-His. **(Figura 5.2).**



**Figura 5.2. Expresión de TARP8, TARP5, TARP5s, TARP7 y TARP7s en células HEK293T.**

Por trabajos previos en el laboratorio, se conocía que la expresión de TARP8, preparando la placa de 6 pocillos el día previo a la transfección y transfectando con PEI, era adecuada, de manera que se empleó como control positivo. Los resultados de Western Blot indicaron que la transfección un día después tras la preparación de la placa de 6 pocillos (TARP8 24h, **Figura 5.2 A**) da lugar a una mayor expresión de TARP8, obteniéndose bandas más intensas a 72 kDa que para la muestra transfectada dos días después de la preparación de la placa de 6 pocillos (TARP8 48h, **Figura 5.2 A**), indicativo de que la densidad celular constituye un parámetro crítico en la eficiencia de la transfección.



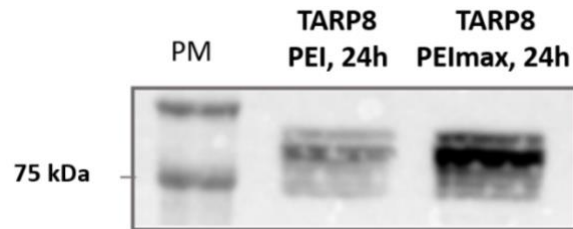
**Figura 5.2 A. Comparación de diferentes tiempos entre preparación de la placa y transfección de TARP8\_eGFP\_pRK5 en células HEK293T.** La transfección 24 horas tras la preparación de la placa, en lugar de 48h, da lugar a una mayor eficiencia en la transfección, como consecuencia de una confluencia celular más laxa.

Las placas transfectadas el día de después de su preparación se encontraban a una confluencia del 70-80%, mientras que las transfectadas dos días después se encontraban cercanas a un 100% de confluencia. Para lograr una transfección adecuada, es necesario que el complejo ADN:PEI sea capaz de atravesar fácilmente la bicapa lipídica mediante endocitosis y liberarse del endosoma, quedando libre en el citosol para poder acceder al núcleo. Ello depende, en gran medida, de la composición de la membrana y de su reformación durante la mitosis, lo que significa que las células deben dividirse activamente. Las células de los pocillos transfectados dos días después de la preparación de la placa se encontraban en senescencia, fase asociada a la situación prolongada de alta densidad celular, sin dividirse activamente. A la par, la alta densidad celular probablemente causó la inhibición por contacto, resultando en una peor captación de los ácidos nucleicos y disminución de la expresión del ADN transfectado.

La comparación relativa entre los dos agentes de transfección ensayados demostró que la expresión de TARP8 fue mayor con PEI-max, frente a PEI (**Figura 5.2 B**). Ambos agentes son polímeros catiónicos de polietilenimina, sin embargo, el PEI contiene grupos *N-acilo*, mientras que el PEI-max está deacilado. La deacilación del compuesto se traduce en un mayor número de nitrógenos accesibles a la protonación, otorgando una alta capacidad tamponadora a un



amplio rango de pH. Una vez el complejo ADN:PEI/PEI<sub>max</sub> se encuentra dentro del endosoma, el PEI-<sub>max</sub> probablemente rompe la vacuola más fácilmente que el PEI, liberando el material genético en el citoplasma. La cantidad de ADN en el citosol y disponible para entrar en el núcleo es presumiblemente mayor empleando PEI-<sub>max</sub>, frente a PEI, lo que se traduce en una mayor eficiencia en la transfección. En concordancia con esto, nuestros resultados del Western Blot demuestran que la expresión de TARP8, empleando PEI<sub>max</sub> en la transfección, es considerablemente mayor que empleando PEI, obteniéndose bandas más intensas y oscuras (**Figura 5.2 B**).

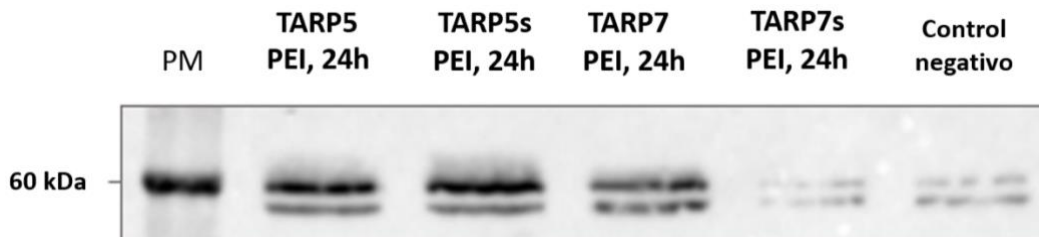


**Figura 5.2 B. Comparación entre PEI y PEI<sub>max</sub> para la transfección de TARP8\_eGFP\_pRK5 en células HEK293T.** La transfección con PEI<sub>max</sub> da rendimientos de expresión superiores, frente a la transfección con PEI.

Por otro lado, también se comparó la expresión entre los genes *CACNG5* (TARP5) y *CACNG7* (TARP7) de *R. norvegicus* y los genes sintéticos (TARP5s y TARP7s). La transfección de los cuatro genes se llevó a cabo de forma equivalente (24 horas tras la preparación de la placa, con PEI) para evitar discrepancias entre los resultados atribuibles al protocolo de transfección. Los resultados del Western Blot, sin embargo, no pusieron de manifiesto ninguna diferencia clara entre los genes de *R. norvegicus* y los genes sintéticos, con una expresión similar entre TARP5 y TARP5s (**Figura 5.2 C**). Los constructos TARP5-eGFP-8xHis y TARP7-eGFP-8xHis tienen un tamaño de 62 kDa, de manera que la banda correspondiente esperable se debería encontrar a la altura de la banda a 60 kDa del marcador de pesos. Sin embargo, el control negativo puso de manifiesto la presencia de una impureza, de peso molecular similar al de las TARP, que el anticuerpo primario anti-His estaba detectando. Esta doble banda también se observó en los carriles correspondientes a la transfección con TARP8 (**Figura 5.2**), confirmando que se trataba de una impureza inespecífica reconocida por el anticuerpo primario empleado. La impureza mencionada apareció en forma de doble banda, a un peso de 60 kDa, ocultando la detección de las TARP de interés.

Los carriles correspondientes a TARP5, TARP7 y TARP7s, sin embargo, mostraron más intensidad que el control negativo, indicativo de la presencia de subunidad auxiliar. La intensidad de las bandas mencionadas puso de manifiesto el acoplamiento de ambas señales,

la específica de la TARP identificada por anti-His y la de la impureza, también identificada por anti-His. Este experimento en concreto mostró que la expresión con TARP7s era equivalente al control negativo, probablemente debido a un error en el proceso de transfección. Las bandas observadas para el carril de TARP7s corresponderían a la impureza, con ausencia de expresión de la subunidad auxiliar.



**Figura 5.2 C. Comparación de la expresión entre los genes *Cacng5* (TARP5) y *Cacng7* (TARP7) de *R. norvegicus* y los genes sintéticos (TARP5s y TARP7s).** En el caso de la isoforma  $\gamma 5$  apenas se observan diferencias entre el gen procedente de rata (carril 2) y el sintético (carril 3). Para la isoforma  $\gamma 7$ , la expresión del gen de rata (carril 4) es mayor que para el gen sintético (carril 5), probablemente por un error en la transfección de TARP7s (dado que su señal es equivalente a la del control negativo). Además, se identifica una impureza a 60 kDa, detectada con el anticuerpo primario anti-His, que oculta la señal específica de las TARP. El aumento de intensidad de la señal de los carriles 1, 2 y 3 frente al control negativo indican la presencia de TARP, combinándose ambas señales (TARP + impureza).

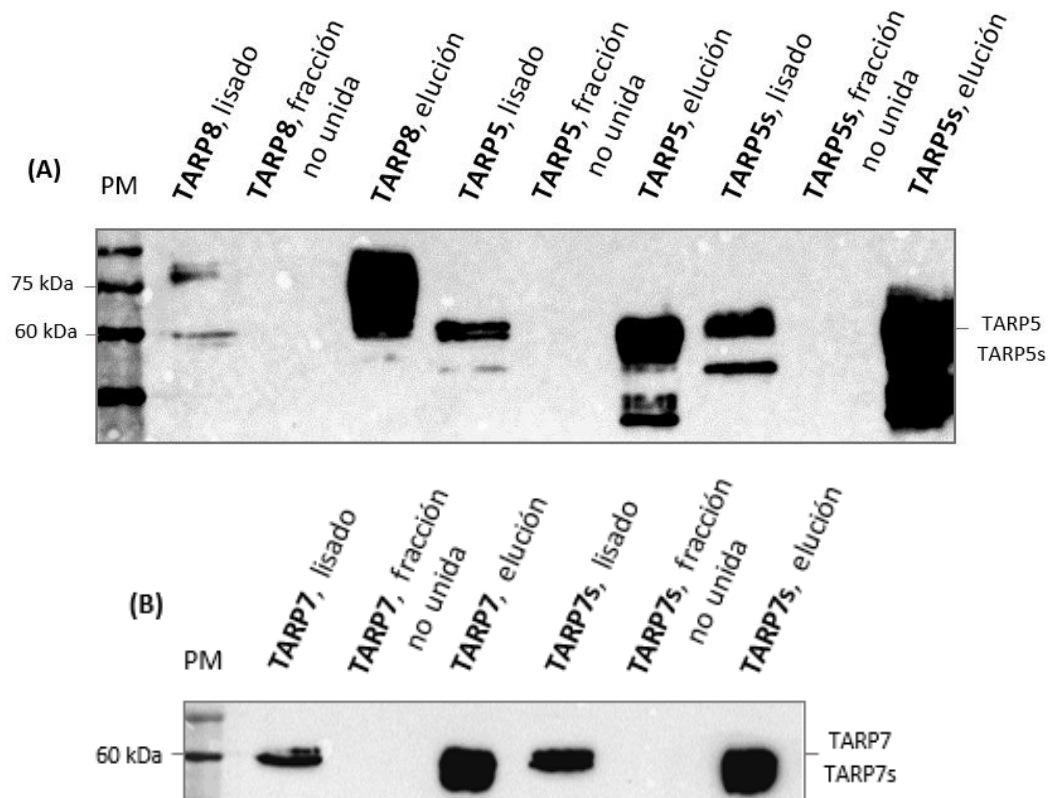
Atendiendo a los resultados anteriores, se concluyó que las transfecciones empleando PEI-max sobre una densidad celular (HEK293T) equivalente a un 70% de confluencia en placas de 6 pocillos otorgaba los rendimientos de transfección más eficientes. De aquí en adelante, las transfecciones se llevaron a cabo bajo las condiciones puntualizadas previamente: 24 horas post preparación de la placa y empleando como agente de transfección PEI-max. Además, para evitar la detección de la impureza mencionada, se consideró el uso de anticuerpo primario anti-eGFP, en lugar de anti-His.

#### 5.2.2 Purificación de subunidades auxiliares y evaluación de la expresión entre genes procedentes de *Rattus norvegicus* y genes sintéticos

Los resultados obtenidos verificaron la purificación de las TARP empleando resina TALON de afinidad por metales. La TARP8, previamente estudiada en el laboratorio, se empleó como control positivo, por conocerse su adecuada extracción y purificación con el protocolo empleado. Las TARP5, 5s, 7 y 7s también se extrajeron y purificaron adecuadamente, obteniéndose bandas intensas y oscuras en torno a 62kDa en las eluciones (**Figura 5.3 A-B, Eluciones**). Además, no se perdió proteína de interés en la Fracción no unida (ausencia de

señal en el Western Blot), indicativo de que la resina era lo suficientemente específica (**Figura 5.3 A-C, Fracción no unida**).

Comparando la purificación de la proteína codificada por el gen de *R. norvegicus* frente al sintético, esto es, TARP5 frente a TARP5s y TARP7 frente a TARP7s, se observó que el gen sintético parecía expresar mejor. La diferencia fue más notable en el caso de la isoforma  $\gamma 5$ , donde la banda a 62 kDa ofreció más señal en la elución correspondiente al gen sintético que la del carril correspondiente al gen procedente de *R. norvegicus* (**Figura 5.3 A**). La diferencia, sin embargo, no es tan evidente en el caso de la isoforma  $\gamma 7$ , donde las bandas observables en las eluciones son casi idénticas (**Figura 5.3 B**).



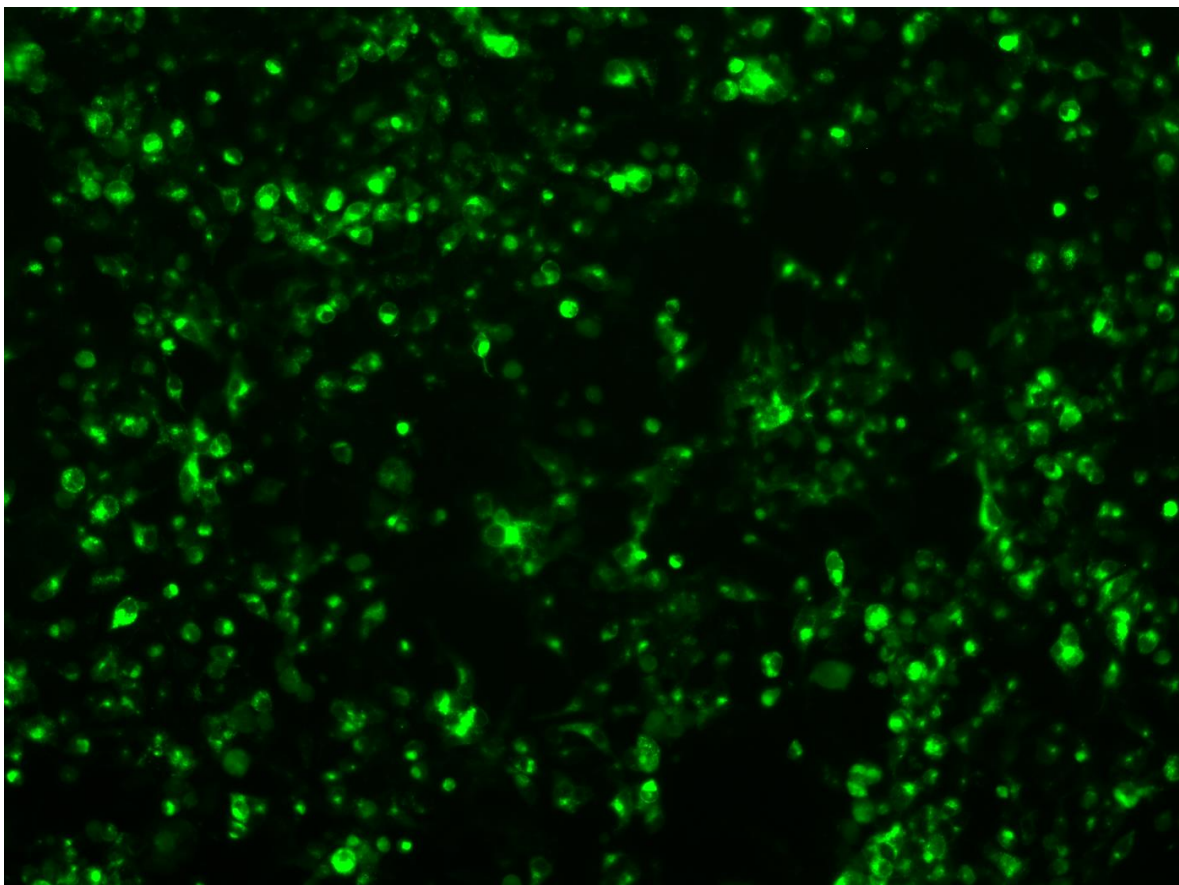
**Figura 5.3. (A) Purificación de TARP8, control positivo, TARP5 y TARP5s con resina TALON.** La banda a 62 kDa de las eluciones confirma la purificación de la subunidad auxiliar. La expresión del gen sintético confiere más señal, banda más oscura e intensa, indicativo de una mayor expresión. **(B) Purificación de TARP7 y TARP7s con resina TALON.** La banda a 62 kDa de las eluciones confirma la purificación de la subunidad auxiliar. No se observan diferencias en cuanto a la expresión del gen sintético frente al gen de rata.

En cualquier caso, atendiendo a que apenas se observaron diferencias entre el gen sintético y el gen de rata para la isoforma  $\gamma 7$ , y que las diferencias en la isoforma  $\gamma 5$  indicaron una mayor

expresión para el gen sintético, se procedió de ahí en adelante a trabajar con los genes sintéticos (TARP5s y TARP7s) para simplificar los experimentos, evitando tener que realizar todos ellos por cuatuplicado.

### 5.3 Obtención de líneas estables

La evaluación de las líneas estables mediante microscopía de fluorescencia demostró que la preparación de las mismas fue satisfactoria (**Figura 5.4**). Se obtuvieron así, dos líneas celulares, una de ellas expresando de forma estable la subunidad auxiliar TARP5s\_eGFP y otra expresando TARP7s\_eGFP.

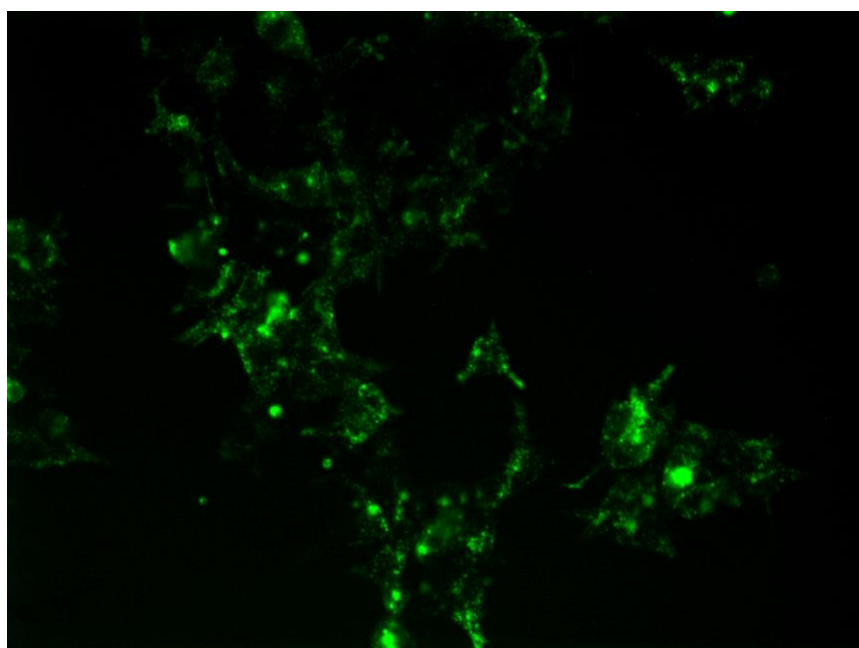


**Figura 5.4. Línea estable para TARP5.** La fluorescencia de las células confirmó la incorporación de TARP5\_eGFP en su genoma, obteniéndose así una línea celular que expresase la subunidad auxiliar de forma estable. El microscopio de fluorescencia también validó la preparación de líneas estables para TARP7, con un aspecto equivalente a las de TARP5 aquí mostradas.

## 5.4 Optimización de la obtención de complejo AMPAR-TARP

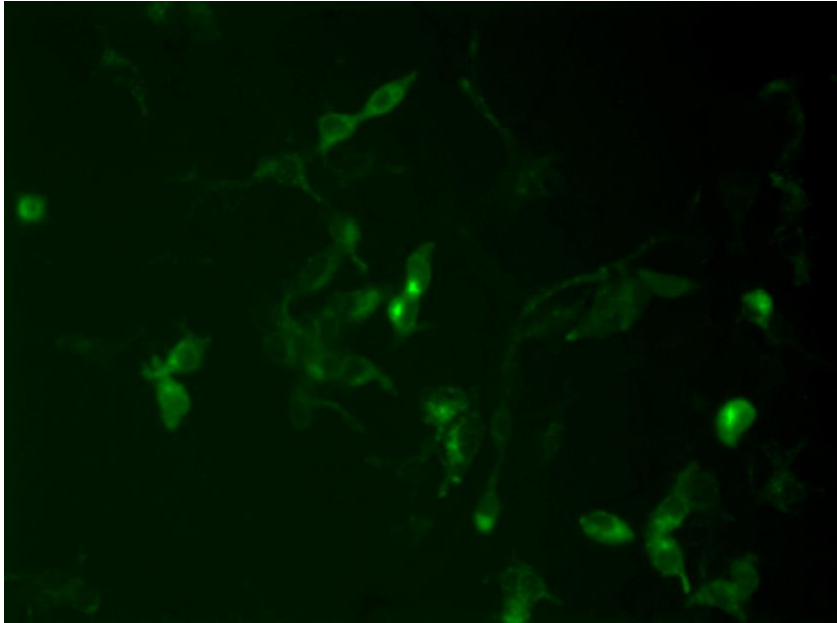
### 5.4.1 Comparación y evaluación de la formación de complejo AMPAR-TARP en HEK-Expi293F y líneas estables

La comparación de ambas líneas celulares (líneas estables y Expi293F) puso de manifiesto diferencias a nivel celular entre la expresión de la subunidad auxiliar y la co-expresión de la subunidad auxiliar en presencia de receptor GluA4. Tanto las líneas estables de TARP5s y TARP7s, como las células Expi293F transfectadas con TARP-eGFP\_pRK5 mostraron, mediante microscopía de fluorescencia, una distribución citoplasmática de la TARP-eGFP (**Figura 5.5 A**). Las células mencionadas presentaban fluorescencia de aspecto granuloso, revelando la formación de agregados de TARP-eGFP, probablemente debido a una excesiva expresión de la subunidad auxiliar. Por otro lado, las líneas estables transfectadas con GluA4-FLAG\_pRK5 y las células Expi293F co-transfectadas con TARP-eGFP\_pRK5 y GluA4-FLAG\_pRK5 parecían aliviar el aspecto granuloso previamente comentado (**Figura 5.5 B**). Además, la fluorescencia presentaba una distribución dirigida hacia la membrana, indicando que el tráfico y localización de las TARP se veía modificado en presencia de receptor GluA4.



**Figura 5.5. Evaluación de la fluorescencia de TARP-eGFP en ausencia y presencia de GluA4 (EXPI293F).**

**(A) EXPI293F transfectadas con TARP5-eGFP\_pRK5.** El patrón de fluorescencia muestra una distribución citoplasmática y granulosa, indicativo de la formación de agregados proteicos.

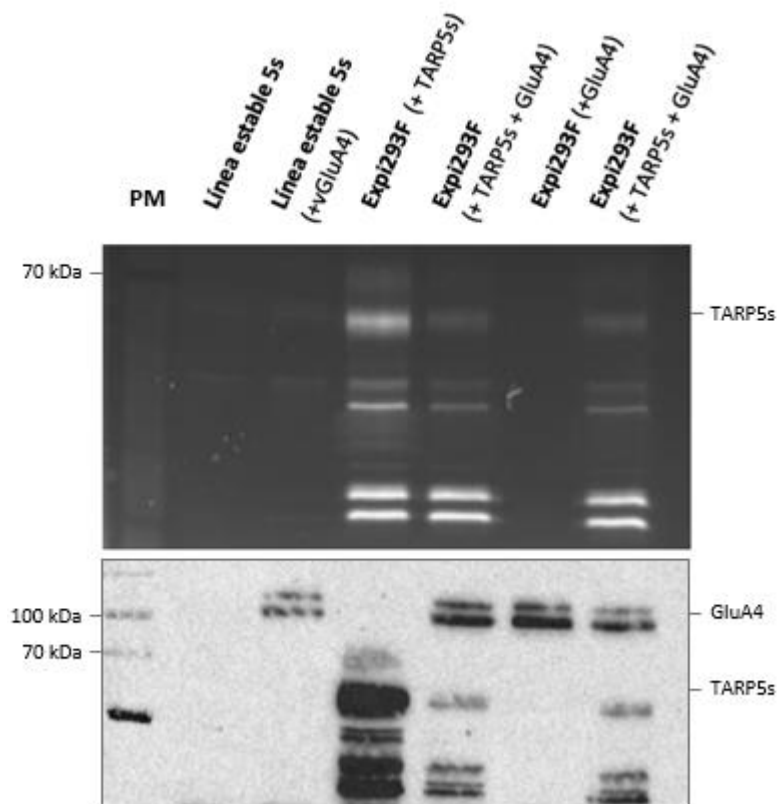


**(B) EXPI293F transfectadas con TARP5-eGFP\_pRK5 y GluA4\_pRK5.**

La fluorescencia observada es menos granulosa, con distribución dirigida hacia la membrana, distinguiéndose el contorno celular. Esto sugiere que la presencia de GluA4 es suficiente como para modificar el tráfico de las TARP y dirigir su localización hacia la membrana, donde interaccionan con los AMPAR.

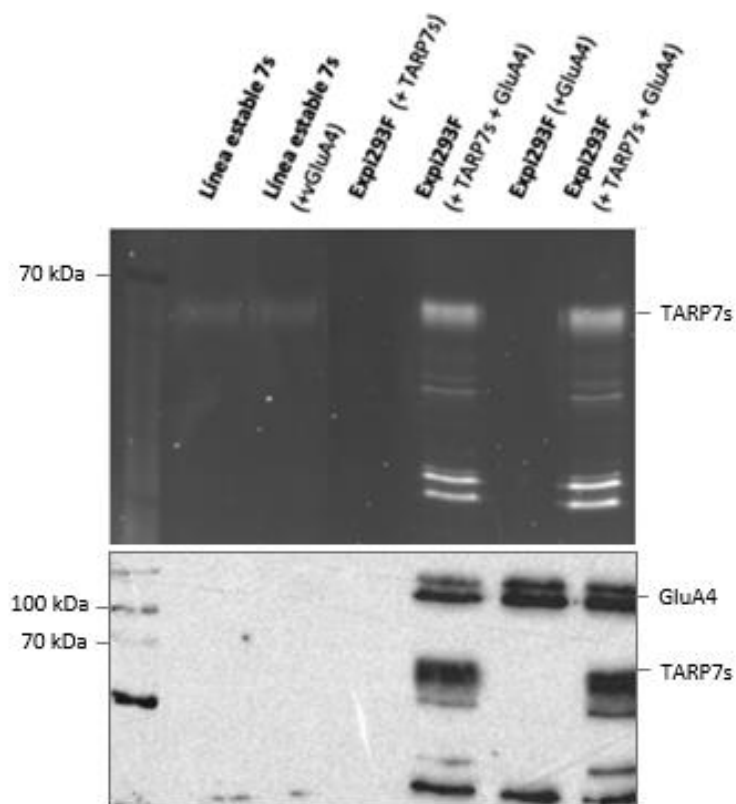
La evaluación de la fluorescencia de los lisados (con DDM) de las líneas estables y Expi293F demostró que la expresión tanto de TARP5s como TARP7s era mayor en la co-transfección de células Expi293F que en la transfección de las líneas estables, con la banda específica a 62 kDa mucho más intensa en el primer caso (**Figura 5.6 A y 5.7 A**). En todos los casos, sin embargo, se observó degradación de la TARP-eGFP, en forma de bandas fluorescentes a distintos pesos moleculares. Es probable que esta degradación se deba a que la proteína fusión es inestable una vez extraída de la membrana. La fusión TARP-eGFP contiene más de 70 residuos en el C-terminal de la TARP que no están estructurados, por lo que es posible que conformen un conector entre la última hélice transmembrana de la TARP y el N-terminal de la GFP que sea particularmente sensible a proteasas. Por otro lado, también se valoró que la degradación podría deberse a la excesiva expresión de TARP-eGFP y su agregación, dado el patrón de expresión observado mediante el microscopio de fluorescencia.

Los resultados anteriores se validaron mediante Western blot, confirmando también la expresión de GluA4, fácilmente identificable por la formación de dos bandas características a un peso de 100 kDa, como resultado de los distintos patrones de glicosilación que presenta el receptor (**Figura 5.6 B y 5.7 B**).



**Figura 5.6. Ensayo de expresión de TARP5s en líneas estables y Expi293F. (Arriba) Fluorescencia (Alexa 488), (Abajo) Western Blot (Anti-GluA4 y Anti-eGFP).**

La co-transfección de células Expi293F con TARP5s-eGFP\_pRK5 y GluA4\_pRK5 da lugar a mayores niveles de expresión de TARP5s que las líneas estables. La lisis con DDM mostraban degradación de la eGFP en todos los casos.



**Figura 5.7. Ensayo de expresión de TARP7s en líneas estables y Expi293F. (Arriba) Fluorescencia (Alexa 488), (B) Western Blot (Anti-GluA4 y Anti-eGFP).**

La co-transfección de células Expi293F con TARP7s-eGFP\_pRK5 y GluA4\_pRK5, igual que para el caso de la isoforma  $\gamma 5$ , da lugar a mayores niveles de expresión de TARP7s que las líneas estables.

El carril 3 debería mostrar fluorescencia, atribuible a la transfección con TARP7s-eGFP\_pRK5, sin embargo, no se observa ninguna banda, probablemente debido a un error durante el proceso de transfección.

Dado que nuestros resultados demostraron que la expresión de TARP5s y TARP7s era mayor en la co-transfección de células Expi293F, se sugirió que la incorporación de TARP en la línea celular podría resultar tóxica para la célula. En la selección de colonias, durante la preparación de las líneas celulares, se eligieron aquellas que presentaban más fluorescencia, indicativo de una mayor expresión de TARP, criterio, sin embargo, que no asegura la viabilidad celular. La sobreexpresión de TARP probablemente dio lugar a la disrupción de la regulación celular, así como a la agregación de la proteína, agotando a las células y disminuyendo su viabilidad en cada pase más rápidamente. Una alternativa planteada para evitar la toxicidad derivada de la sobreexpresión en las líneas estables podría ser la producción de líneas estables inducibles. De esta forma, se aseguraría la viabilidad celular, forzando la expresión de TARP tipo II únicamente bajo las condiciones establecidas en el momento del experimento.

Atendiendo a los resultados previamente discutidos, los experimentos posteriores de expresión de complejo AMPAR-TARP se realizaron en células Expi293F.

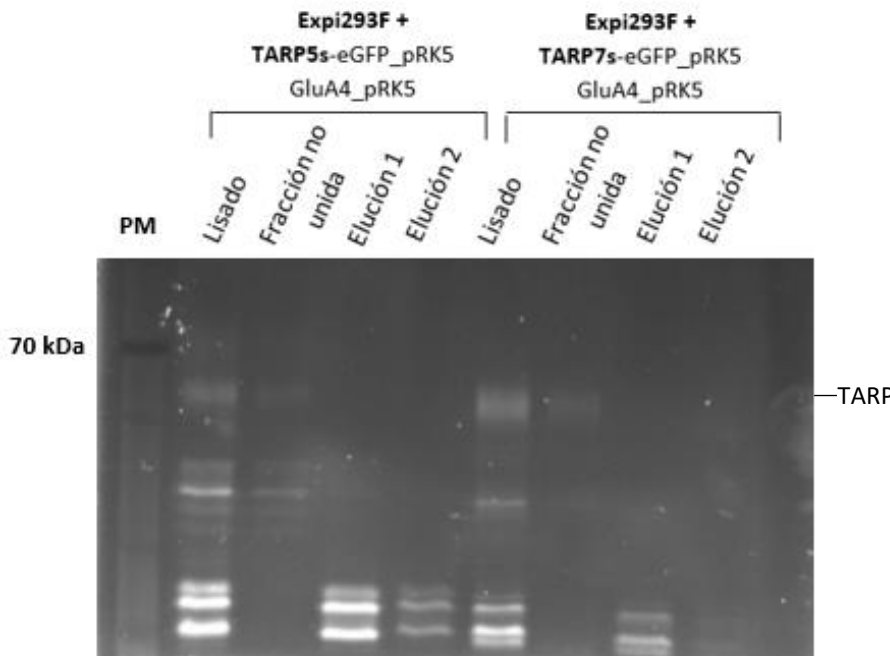
#### 5.4.2 Evaluación de la extracción y purificación de complejo AMPAR-TARP con GDN

Para estudiar la extracción con un segundo detergente, comparando con los resultados del apartado anterior (lisis con DDM), y valorar la purificación de complejo, se llevó a cabo una purificación de AMPAR-TARP con GDN y resina TALON. Los resultados de fluorescencia demostraron que la purificación con GDN permitió extraer de forma adecuada la TARP (**Figura 5.8**), de forma similar a la extracción con DDM del apartado anterior. Los lisados de la extracción con GDN mostraron un perfil de bandas a distintos pesos moleculares, indicativo de la presencia de TARP-eGFP degradada.

El GDN, o glico-diosgenina es un detergente sintético, sustituto de la digitonina (DDM), con peso molecular similar pero un CMC mucho más pequeño. El GDN es más suave que el DDM, de manera que resulta útil para la estabilización de complejos de membrana, evitando la ruptura y separación de los componentes del complejo, como es el caso de AMPAR-TARP. El DDM, en cambio, permite una extracción de las proteínas de membrana más fuerte, pero estabiliza peor los complejos. En la bibliografía se describe que la purificación con DDM de complejos AMPAR-TARP, da lugar a la pérdida secuencial de subunidad auxiliar, de manera que, cuando se resuelven las estructuras mediante crio-microscopía electrónica, se obtienen varios complejos con distintos ratios AMPAR-TARP. Lo importante, por tanto, es llegar a un



equilibrio entre los detergentes empleados, asegurando tanto la extracción proteica, como la estabilización de los complejos estudiados.



**Figura 5.8, B. Evaluación mediante fluorescencia de la extracción con GDN de TARP5s (izq) y TARP7s (dcha) en líneas estables y Expi293F. La purificación del complejo se llevó a cabo empleando resina TALON. El GDN mostró una extracción adecuada, por la presencia de bandas fluorescentes en el gel.**

Atendiendo a las diferentes fracciones recogidas de la purificación, los resultados mostraron pérdida de TARP-eGFP en la fracción no unida de la purificación, probablemente debido a la una insuficiente incubación de la resina con el lisado celular.

Dado que en la purificación se debería enriquecer significativamente en la proteína de interés, hubiésemos esperado un patrón de fluorescencia mucho más intenso en las eluciones, sin embargo, es bastante modesto. La purificación de las subunidades auxiliares empleando TALON (Apartado 5.3.2), en comparación, tuvo éxito, logrando purificar las TARP. Por tanto, planteamos que, en la formación de complejo, la cola de histidinas que reconoce la resina TALON, probablemente se encontró menos accesible, disminuyendo considerablemente los rendimientos de la purificación. Dado que las bandas de fluorescencia obtenidas en las eluciones eran de menor peso molecular que el complejo TARP-eGFP, también se planteó que la fusión TARP-eGFP pudo haberse roto por la región no estructurada del C-terminal de TARP, tal y como se ha discutido en el apartado anterior.

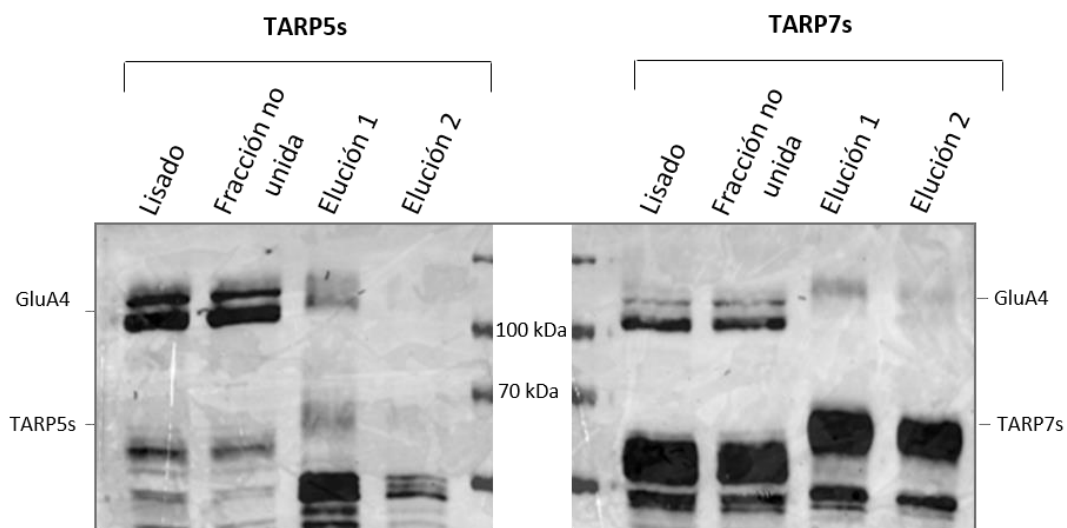
Atendiendo a estos últimos resultados, se planteó el uso de otras resinas de afinidad, que permitieran confirmar la expresión de complejo AMPAR-TARP y optimizar la purificación del

mismo. Además, nuestros resultados sugieren que las diferencias en la lisis de células expresando complejo AMPAR-TARP, tanto con DDM como con GDN, no son significativas, lográndose una extracción similar para ensayos a una magnitud de placa de 6 pocillos. Sin embargo, para la producción de proteína a gran escala, se planteó el uso de los dos detergentes ensayados: DDM para extraer la máxima proteína posible, dado que se trata de un pellet procedente de un cultivo de mamífero de gran volumen, y su sustitución secuencial por GDN, para evitar la purificación de distintos complejos con diferentes ratios AMPAR:TARP.

## 5.5 Optimización de la producción y purificación de complejo AMPAR-TARP en células de mamífero

### 5.5.1 Purificación a media escala

La incubación del lisado, resultado de la co-transfección, con la resina de nanobody anti-GFP permitió purificar el complejo, si bien la eficiencia de la unión no fue muy alta. Así, el carril de “fracción no unida” indicó que se estaba perdiendo tanto GluA4 (doble banda a 100 kDa) como TARP-eGFP (banda a 62 kDa), probablemente debido a un problema de escalado e insuficiente cantidad de resina empleada (**Figura 5.9**).



**Figura 5.9. Purificación de complejo AMPAR-TARP, empleando resina de nanobody anti-eGFP.**

Las eluciones confirmaron la purificación del complejo GluA4 (banda a 100kDa) y TARP5s y 7s (banda principal a 62 kDa).

Aunque se perdió complejo en la fracción no unida, la presencia de bandas en las eluciones confirmó la formación de complejo (**Figura 5.9**). Las eluciones aparecieron enriquecidas en TARP-eGFP, probablemente debido a la sobreexpresión de la misma en las células, tal y como

ya se ha discutido en apartados anteriores. Sin embargo, se volvió a observar el patrón de bandas a diferentes pesos moleculares, indicativo de la degradación de TARP-eGFP, como consecuencia de su agregación. Esta degradación conllevó la escisión entre TARP y eGFP y, por ende, el receptor GluA4 que interacciona con la subunidad auxiliar, se perdería con la TARP en la “fracción no unida”. Esto explicaría la tenue señal obtenida para GluA en las eluciones, mientras que la señal de TARP-eGFP compensaría esa pérdida debido a su sobreexpresión.

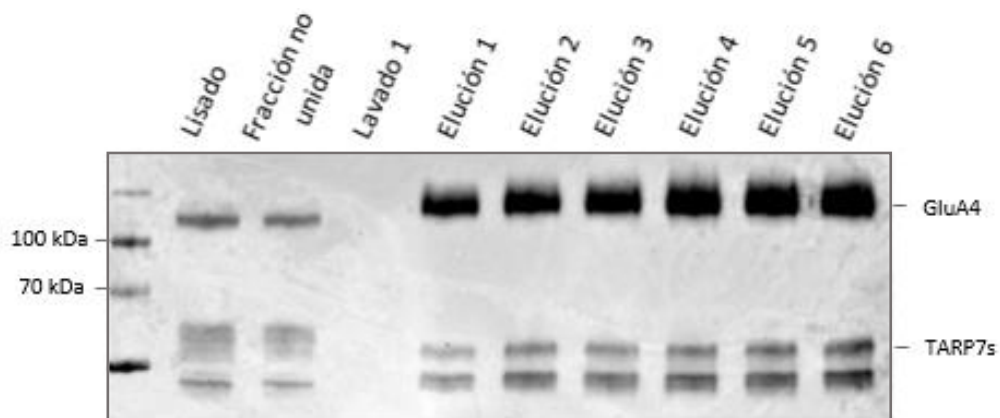
La **Figura 5.9** muestra, de forma más evidente para la isoforma  $\gamma 7$ , que el perfil de bandas aparece retardado en las eluciones, respecto al lisado y la fracción no unida. La recuperación de la proteína de la resina de nanobody anti-eGFP se llevó a cabo mediante elución ácida, con glicina pH 3.5, que podría haber modificado la movilidad electroforética de las proteínas. Por otro lado, dado que las dos bandas de GluA4 corresponden a distintos estados de glicosilación del receptor, se plantea que TARP se habría unido preferencialmente a uno de los dos estados. El estado de menor peso molecular (banda de abajo) correspondería a una fracción glicosilada de GluA4 intracelular, mientras que el estado de mayor peso molecular (banda de arriba) correspondería con una banda de glicosilación extracelular. Al purificar con resina anti-GFP, que se une a TARP, unida, a su vez, a GluA4, se enriquece en el estado de glicosilación extracelular.

La isoforma  $\gamma 7$  se obtuvo más claramente, tanto en la elución 1 como en la 2, con la banda a 62 kDa, correspondiente a la TARP7s, indicando una alta expresión (banda ancha e intensa), por lo que se procedió en adelante a trabajar con esta subunidad. Sin embargo, la unión de eGFP a la resina, ya sea por medio de nanobody anti-GFP o por afinidad a la etiqueta de His, no resultó del todo eficiente, ya que gran parte de TARP-eGFP se encontraba en la fracción no unida. Dado que sí que se confirmó la presencia de complejo, se procedió a la purificación a gran escala del complejo GluA4-TARP7s. Para ello, se co-transfectó GluA4-FLAG\_pRK5 y TARP7s-eGFP\_pRK5 en un ratio 2:1, con la premisa de que la transfección de menor cantidad de TARP7s daría una expresión más modesta con menos agregación. Además, se empleó resina anti-FLAG, evitando el problema de la inaccesibilidad a la GFP por la agregación o de la etiqueta de Histidinas por la formación de complejo. Adicionalmente, dirigir la purificación hacia la captura de GluA4\_FLAG, permitiría obtener todo el receptor presente en la muestra.

### 5.5.2 Purificación a gran escala

Mediante la resina de afinidad anti-Flag se logró purificar el complejo de forma más eficiente (**Figura 5.10**). En todas las eluciones realizadas se enriqueció en GluA4, identificado como una doble banda (en este caso fusionada en una sola banda por la alta señal obtenida) en torno a los 100 kDa, y la TARP7s\_eGFP, en forma de varias bandas a distintos pesos moleculares, indicativo de la degradación de la misma, con la banda principal a 62 kDa. La misma señal se obtuvo en la fracción no unida, aunque de forma menos intensa, lo que sugirió que se perdió parte del complejo de forma parcial. En futuros experimentos se planteó la reincubación de la fracción no unida con la resina anti-Flag o alargar los tiempos de incubación con el fin de mejorar el rendimiento del proceso.

Por otro lado, la intensidad de las bandas no disminuye en las últimas eluciones, lo que sugiere que parte del complejo habría quedado retenido en la resina de afinidad. Realizar eluciones adicionales, aumentar el tiempo de elución, incrementar la concentración del péptido 3xFLAG o aumentar la temperatura (incluso hasta los 37 °C) son algunas de las variables a modificar para incrementar la eficiencia de la elución.

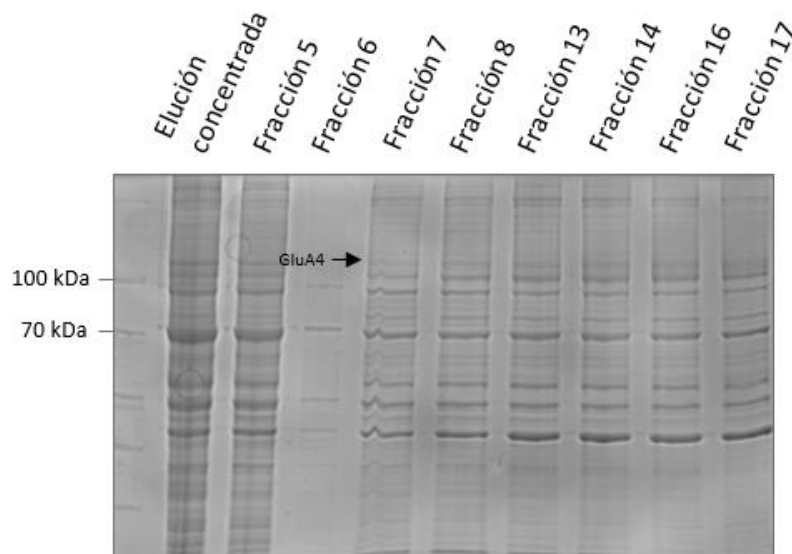


**Figura 5.10. Purificación de complejo AMPAR-TARP, empleando resina anti-FLAG.** La purificación enriqueció las eluciones en GluA4 y TARP7s, sin pérdida en los lavados. La intensa señal en “Elución 6” es indicativo de que la proteína no se eluyó por completo, quedando parte unida a la resina.

El resultado de la tinción con azul de Coomassie, sin embargo, demostró que, pese a la presencia de complejo (detectado mediante Western Blot, **Figura 5.10**), se purificaron varias impurezas (**Figura 5.11**). Las bandas por debajo del peso molecular de 62 kDa podrían adjudicarse a la degradación de la TARP-eGFP, resultado de su degradación, tal y como se

venía observando mediante fluorescencia en varios resultados previos. Sin embargo, las múltiples bandas por encima de 62 kDa demostraban la presencia de varias impurezas.

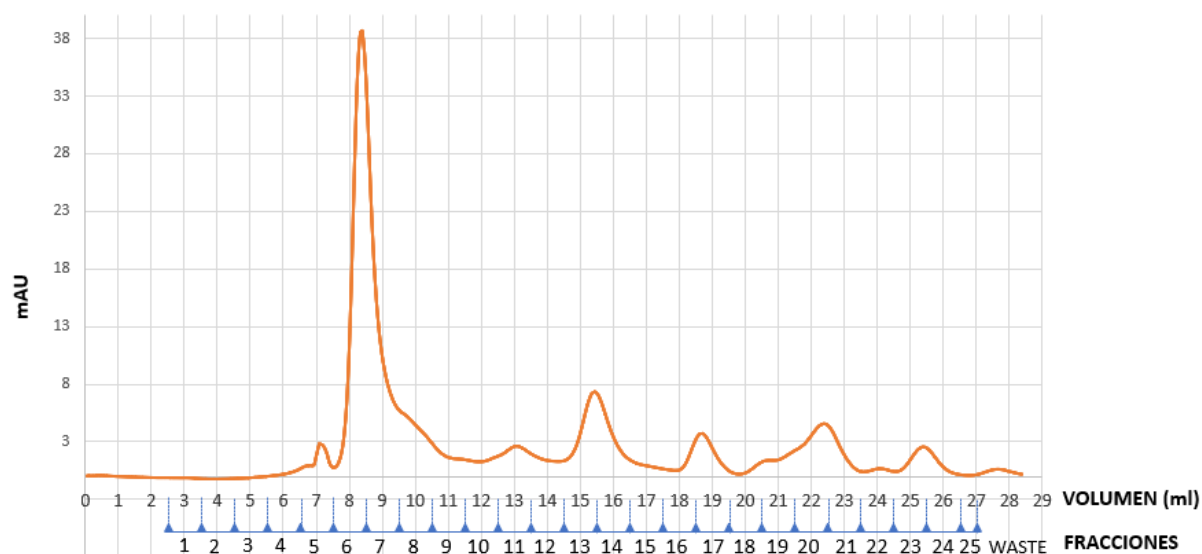
En el manejo de la resina ya se observó agregación de las esferas. Esta agregación podría haber dado lugar a la desnaturalización del anticuerpo, con exposición de zonas hidrófobas, favoreciendo la unión de impurezas. Otra posibilidad es que el lisado estuviese altamente concentrado, facilitando la unión de la proteína de interés, pero también de las impurezas presentes, a la resina. Para evitarlo, se podría añadir más volumen de tampón de lisado, diluyendo la muestra y, con ello, la concentración de impurezas.



**Figura 5.11. Tinción con azul de Coomassie.** La tinción de todas las proteínas del gel puso de manifiesto la presencia de múltiples impurezas co-purificadas junto a GluA4 y TARP7s en las eluciones.

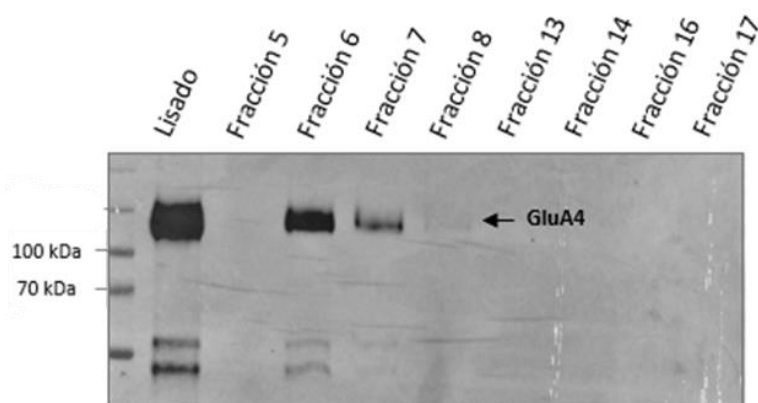
La cromatografía de exclusión molecular permitió separar las proteínas de las eluciones anteriores en función de su tamaño molecular. Generalmente, el GluA4 en forma de tetrámero, para las condiciones de cromatografía establecidas, se obtiene a partir de la fracción 7 (a partir de 8 ml). En consonancia, el fraccionamiento de nuestra muestra de interés dio lugar a un pico mayoritario en torno a la fracción 6 y 7, principalmente, y parte de la fracción 8 (**Figura 5.12**). Sin embargo, se observa que hacia el final de la fracción 7 aparece un hombro, adyacente al pico principal, que probablemente se corresponda con otra proteína de distinto tamaño. También se obtuvieron picos minoritarios en otras fracciones (13, 14, 16 y 17), atribuibles a las impurezas detectadas.

## Cromatografía de exclusión molecular



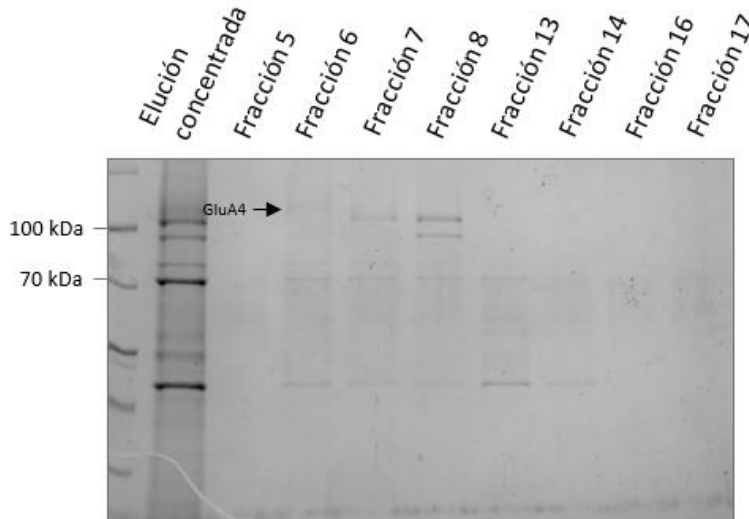
**Figura 5.12. cromatografía de Exclusión Molecular.** El pico correspondiente al tetrámero de GluA4 se obtuvo en las fracciones 6 y 7, principalmente. Adyacente a éste, se registró un hombro, indicativo de la presencia de una proteína distinta, en la fracción 8.

El receptor GluA4 se identificó mediante Western Blot, confirmando la presencia de GluA4 y TARP7s en la fracción 6, principalmente, y en menor medida en las fracciones 7 y 8 (**Figura 5.13**). La doble banda (fusionada en una sola) característica del GluA4 a 100 kDa se observó con mayor intensidad en la fracción 6, indicativo de una mayor concentración. También se identificaron varias bandas a distintos pesos moleculares, correspondientes a la TARP7s-eGFP degradada.



**Figura 5.13. Detección mediante Western Blot de GluA4 y TARP7s-eGFP.** Las bandas a 100kDa y el perfil de bandas representativo de la degradación de TARP-eGFP, confirmó la presencia de AMPAR-TARP en las fracciones 6, mayoritariamente, 7 y 8 de la cromatografía de exclusión molecular.

La tinción de azul de Coomassie de las fracciones 5, 6, 7, 13, 14, 16 y 17, sin embargo, demostró que, aunque la mayoría de las impurezas se separaron mediante la cromatografía de exclusión molecular, en las fracciones 6, 7 y 8 se seguían observando múltiples bandas inespecíficas (**Figura 5.14**).



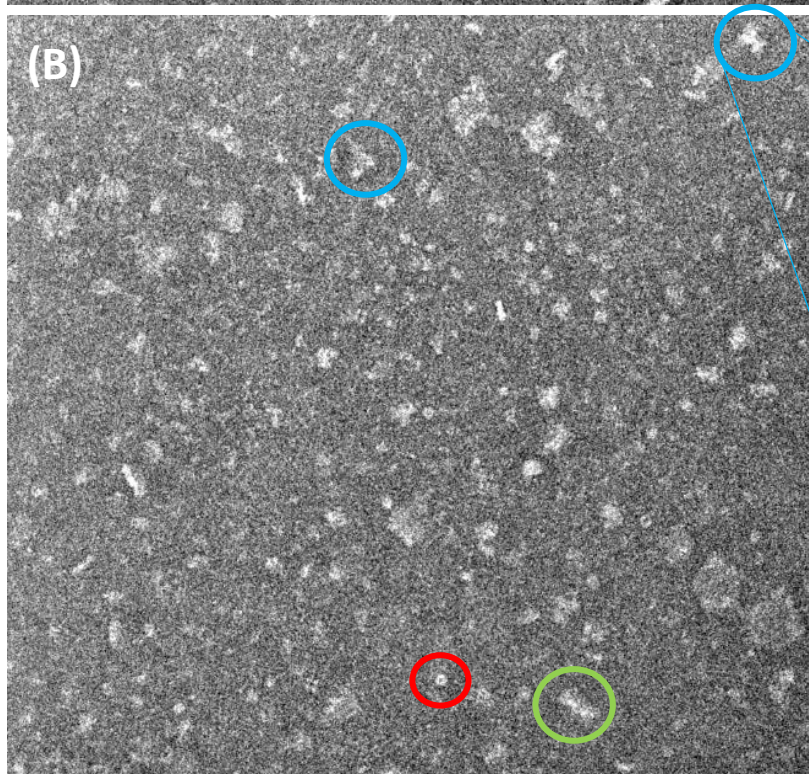
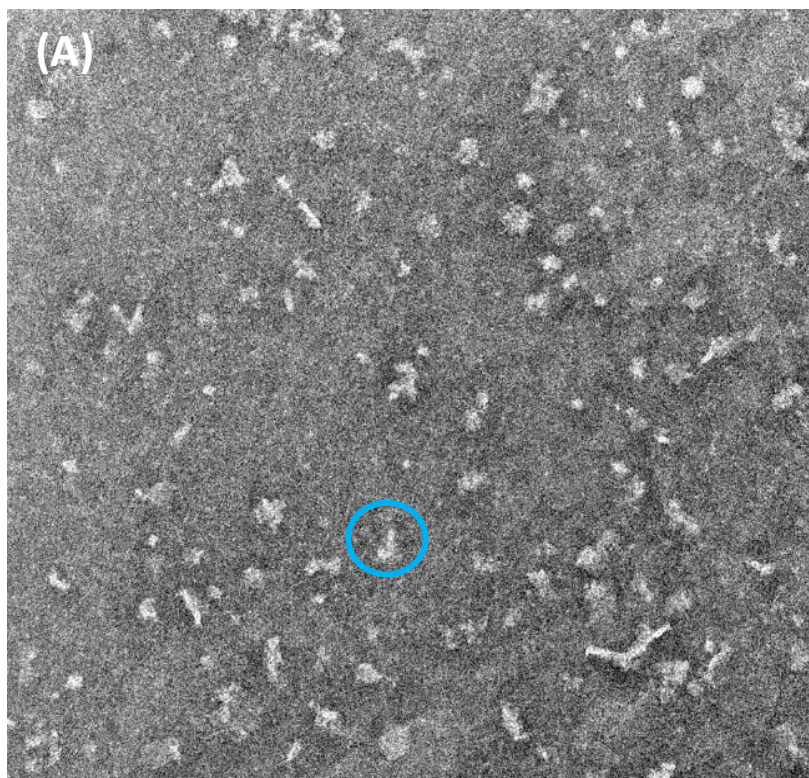
**Figura 5.14. Tinción con azul de Coomassie.** La tinción de todas las proteínas del gel reflejó la presencia de impurezas en las fracciones de la cromatografía de exclusión molecular. Las bandas por debajo de 62 kDa se corresponden a la degradación de TARP-eGFP.

Las fracciones 6, 7 y 8 se concentraron independientemente, obteniéndose una concentración de 0,4 mg/ml en la fracción 6, 0,2 mg/ml en la fracción 7 y 0,2 mg/ml en la fracción 8, concentraciones adecuadas para la preparación de rejillas para tinción negativa.

### 5.6 Estudio estructural preliminar mediante microscopía electrónica de tinción negativa

Con el microscopio electrónico se tomaron 82 micrografías de las rejillas preparadas para las fracciones 6 y 7 concentradas de la cromatografía de exclusión molecular. Las micrografías mostraron las partículas proteicas de color blanco sobre un fondo gris oscuro, resultado de la tinción con NanoW. Tanto en la fracción 6, como la 7, se observaron partículas que, por su aspecto preliminar y tamaño (en torno a 200 Å) podrían tratarse de homotetrámeros GluA4 (círculo azul, **Figura 5.15 A-B**). En las micrografías, la visión lateral del receptor generalmente muestra una protrusión, correspondiente a la micela en la que aparece embebido el receptor, con dos segmentos prominentes, ligeramente separados entre sí (en forma de “Y”), que se corresponden con los dominios NTD. La subunidad auxiliar TARP7s, por sus dimensiones, es indetectable a simple vista sobre las micrografías.

En todas las micrografías se observaron partículas de varios tamaños que, claramente, no correspondían al receptor AMPAR. También se advirtieron artefactos de gran tamaño, que probablemente correspondían a agregados de GluA.



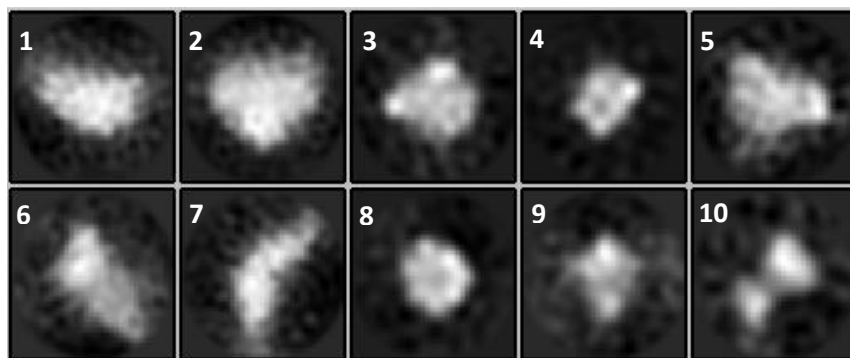
**Figura 5.15. Micrografías representativas de (A) la fracción 6 y (B) fracción 7.** Con un desenfoque de  $-1.6 \mu\text{m}$  y magnificación nominal de 125.000 x. Con un círculo azul, rodeada una partícula de cada fracción representativa del homotetrámero GluA4. En rojo, la chaperona co-purificada junto al AMPAR en la fracción 7. En verde, una impureza de aspecto alargado y cilíndrico, identificado en las micrografías de la fracción 7.

En las micrografías de la fracción 7, se observó una impureza de aspecto esférico, previamente descrita en la bibliografía como una chaperona de 70 kDa co-purificada junto a GluA2 en células HEK293T<sup>53</sup> (círculo rojo, **Figura 15B**). La eliminación de la chaperona contaminante es posible mediante lavados de la columna con 50 mM de imidazol pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM C<sub>12</sub>M, 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 1 mM ATP, tal y como se describe en la bibliografía. En la fracción 7



también se detectó una segunda impureza bastante abundante en la muestra, con aspecto de partícula cilíndrica y alargada, de gran tamaño (círculo verde, **Figura 15B**). Estas impurezas probablemente se corresponden con el hombro adyacente al pico principal de las fracciones 6-7 en la cromatografía de exclusión molecular y con las bandas inespecíficas obtenidas en la tinción con azul de Coomassie (Apartado **5.6.2**). De hecho, una de las bandas más intensas en la **Figura 5.12** aparece a 70 kDa, peso molecular de la chaperona contaminante, y persiste tras la filtración en gel (**Figura 5.13**), lo que explicaría que posteriormente aparezca en las micrografías tomadas.

El procesamiento de las micrografías, con extracción, limpieza y clasificación 2D, se realizó tratando las 82 micrografías totales (micrografías fracción 6 + micrografías fracción 7) como un único conjunto. Tras varias rondas de refinado, se obtuvieron 10 clases 2D preliminares (**Figura 5.16**).



**Figura 5.16. Clasificación 2D del set de 82 micrografías.** Aplicando traslaciones y rotaciones, las partículas se clasificaron en 10 clases 2D preliminares. Las clases 5 y 10 podrían corresponderse al complejo AMPAR-TARP. Las clases 4 y 8 podrían representar la chaperona contaminante.

Las clases 4 y 7 podrían corresponderse a la chaperona mencionada previamente, mientras que las clases 5 y 10 podrían corresponderse a la perspectiva lateral de un AMPAR, con la micela embebiendo al receptor y los segmentos que emergen correspondiendo al NTD. Para poder obtener el modelo estructural del complejo GluA4-TARP7 sería necesario reconstruir la estructura tridimensional a partir de las clases 2D obtenidas. Sin embargo, dado que ninguna de las clases mostró evidencias indiscutibles de tratarse de AMPAR, no se procedió con el siguiente paso de procesamiento.

## 5.7 Perspectivas y posibles modificaciones

Aunque a lo largo de la memoria se han discutido los resultados obtenidos en relación con los objetivos propuestos, en esta sección se recopilan brevemente las posibles modificaciones del trabajo experimental, así como el planteamiento de las perspectivas de futuro.

En primer lugar, comenzando por la base molecular y cimiento sobre el que se asienta el resto del trabajo experimental, se propone explorar la producción de GluA4 y subunidades auxiliares. Una de las opciones consistiría en preparar constructos en tándem, clonando el gen del receptor y el gen de la subunidad auxiliar deseada en el mismo vector. Esta opción se barajó en una primera instancia, sin embargo, se estimó que el clonaje en tándem forzaría la formación del complejo y la estequiometría, mientras que su co-transfección en vectores separados favorecería la formación del complejo en condiciones celulares fisiológicas. Trabajando en las modificaciones de los vectores empleados (TARP-eGFP\_pRK5 y GluA4-FLAG\_pRK5), resultaría interesante preparar distintas versiones del mismo, como clonando eGFP en el extremo N-terminal de TARP en lugar del C-terminal, para valorar si la localización de estos elementos favorece o dificulta la posterior expresión y purificación. Por ejemplo, variaciones en la localización de la etiqueta de Hisx8 en la subunidad auxiliar, podrían facilitar el reconocimiento de la misma por la resina TALON empleada. También se podrían añadir otras colas de afinidad distintas, como 1D4, en lugar de la eGFP. La eGFP es útil para monitorizar los ensayos por fluorescencia, pero al tratarse de una proteína grande, su fusión a TARP podría alterar las propiedades de la subunidad auxiliar. Además, se plantea la evaluación de otras variantes del gen, más allá de su origen (*R. norvegicus* o sintético), como diferencias entre las isoformas flip y flop o entre isoformas de cola C-terminal larga y corta. El *screening* de todos los constructos propuestos mediante ensayos de expresión permitiría una elección más crítica y precisa de cuáles son las bases genéticas óptimas.

En segundo lugar, se plantean alternativas a nivel celular. Una de las opciones ya propuestas consistiría en la producción de líneas estables inducibles, de manera que la proteína de interés se expresase momentáneamente, evitando posibles efectos tóxicos, sobreexpresión de la misma que derive en agregación y agotamiento celular. Además, una vez transfectadas las células, se podría rebajar la temperatura a los 30 °C reduciendo así el metabolismo y crecimiento celular, pero favoreciendo el plegamiento proteico. Aunque la producción de

proteína no fuese tan elevada, podría favorecerse el plegamiento y ensamblado del complejo, mejorando después los ensayos posteriores de purificación y producción a gran escala. También se valora la posibilidad de que el receptor GluA4 no termine de madurar en las células Expi293F, para lo que resultaría interesante estudiar otras líneas, como HEK293 GntI-. Esta línea es deficiente en actividad N-acetilglucosaminiltransferasa I (*GntI*), por tanto, carece de N-glicanos complejos, y se ha utilizado con éxito para la purificación de otros iGluRs<sup>54</sup>.

Una vez optimizadas la base molecular y celular, resultaría interesante evaluar distintos aspectos más específicos, como la adición de aditivos que estabilicen el complejo AMPA-TARP (y su evaluación mediante registro con fluorímetro del cambio en la temperatura de *melting*), ensayos de estabilización con un set de detergentes para optimizar la purificación.

## 6 CONCLUSIONES

1. El sistema *IVA cloning* permitió obtener los constructos TARP5\_eGFP\_pRK5, TARP5s\_eGFP\_pRK5, TARP7\_eGFP\_pRK5, TARP7s\_eGFP\_pRK5 en un único paso de PCR y sin necesidad de emplear enzimas de restricción.
2. La transfección química, empleando el agente PEI-max, de células Expi293F a una confluencia del 70-80% (preparación de la placa de 6 pocillos 24 horas previas a la transfección) ofreció los rendimientos de transfección más altos, optimizando así el proceso y confirmando la adecuada expresión de los constructos obtenidos en el punto 1.
3. La co-transfección de células Expi293F con TARP-eGFP\_pRK5 y GluA4-FLAG\_pRK5 ofreció una mayor expresión de complejo GluA4-TARP que las líneas estables de TARP transfectadas con GluA4-FLAG\_pRK5, en las que la sobreexpresión de TARP resultó tóxica a largo plazo.
4. La transfección de TARP-eGFP dio lugar a niveles de expresión muy altos que conllevaron la agregación de la proteína, lo que dificultó notablemente la obtención de complejo, cuando la purificación se dirigió a la proteína GFP o su cola His:
  - 5.1 La resina TALON permitió purificar específicamente las subunidades auxiliares expresadas en células de mamífero Expi293F. Sin embargo, presentó bajos rendimientos en la purificación de complejo AMPAR-TARP, debido a la escisión de TARP-eGFP e inaccesibilidad de la resina a su cola de histidina, como consecuencia de su interacción con el receptor.
  - 5.2 La resina anti-eGFP permitió purificar el complejo AMPAR-TARP a media escala, confirmando la formación del mismo en células Expi293F. Sin embargo, la escisión de TARP-eGFP generó pérdidas importantes de proteína.
5. La resina anti-FLAG permitió purificar el complejo a gran escala. Sin embargo, se copurificó también un alto número de impurezas, dificultando la determinación preliminar de la estructura mediante microscopía electrónica de tinción negativa.

## CONCLUSIONS

1. The IVA cloning system made it possible to obtain the TARP5\_eGFP\_pRK5, TARP5s\_eGFP\_pRK5, TARP7\_eGFP\_pRK5, TARP7s\_eGFP\_pRK5 constructs in a single PCR step and without the need to use restriction enzymes.
2. Chemical transfection of Expi293F cells at 70-80% confluence (6-well plate preparation 24 hours prior to transfection) with PEI-max offered the highest transfection yields, thus optimizing the process and confirming the adequate expression of the constructs obtained in point 1.
3. Co-transfection of Expi293F cells with TARP-eGFP\_pRK5 and GluA4-FLAG\_pRK5 offered higher expression of the GluA4-TARP complex than TARP stable lines transfected with GluA4-FLAG\_pRK5, in which TARP overexpression turned out to be toxic in long term.
5. TARP-eGFP transfection resulted in high levels of expression, ultimately leading to protein aggregation, making it difficult to purify the protein when targeting GFP or the His tail.
  - 5.1 TALON resin specifically purified TARP type II expressed in Expi293F mammalian cells. However, it led to low yields when purifying the AMPAR-TARP complex, due to the cleavage of TARP-eGFP and inaccessibility of the resin to its histidine tail, as a consequence of its interaction with the receptor.
  - 5.2 The anti-eGFP resin purified the AMPAR-TARP complex on a medium scale. However, TARP-eGFP cleavage resulted in significant protein losses.
6. The anti-FLAG resin allowed large-scale purification of the complex. However, many impurities were also co-purified, making preliminary determination of the structure by negative staining electron microscopy difficult.

## 7 BIBLIOGRAFÍA

1. Hahn, G., Ponce-Alvarez, A., Deco, G., Aertsen, A. & Kumar, A. Portraits of communication in neuronal networks. *Nat. Rev. Neurosci.* **20**, 117–127 (2019).
2. Curti, S. & O'Brien, J. Characteristics and plasticity of electrical synaptic transmission. *BMC Cell Biol.* **17**, 59–70 (2016).
3. Martin, E. A., Lasseigne, A. M. & Miller, A. C. No Title. *Front. Neuroanat.* **14**, 12 (2020).
4. Jabeen, S. & Thirumalai, V. The interplay between electrical and chemical synaptogenesis. *J. Neurophysiol.* **120**, 1914–1922 (2018).
5. Caire, M. R., Coleman, S. M. & AMPA, J. StatPearls [Internet]. Obtenido de Physiology, Synapse.: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526047/> Isoform-Specific Early Trafficking of Flip. *J. Neurosci. doi101523JNEUROSCI230106* **26**, 11220–11229 (2006).
6. Glasgow, S. D., McPhedrain, R., Madranges, J. F., Kennedy, T. E. & Ruthazer, E. S. Approaches and Limitations in the Investigation of Synaptic Transmission and Plasticity. *Front. Synaptic Neurosci.* **11**, 20 (2019).
7. Malenka, R. C. & Südhof, T. C. Understanding Synapses: Past, Present, and Future. *Neuron* **60**, 469–476 (2008).
8. Spruston, N. Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 206–221 (2008).
9. Niswender, Colleen; Conn, J. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **50**, 295–322 (2010).
10. Lovinger, D. M. Communication Networks in the Brain Neurons, Receptors, Neurotransmitters, and Alcohol. *Alcohol Res. Heal.* **31**, 196–214 (2008).
11. Traynelis, S. F. *et al.* Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev.* **62**, 405–496 (2010).
12. Gantz, S. C., Moussawi, K. & Hake, H. S. Delta glutamate receptor conductance drives excitation of mouse dorsal raphe neurons. *Elife* **9**, (2020).
13. Rousseaux, C. & J, J. A review of glutamate receptors I: Current understanding of their biology. *Pathol doi101293tox2125* **21**, 25–51 (2008).
14. Willard, S. S. & Koochekpour, S. Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways. *International Journal of Biological Sciences* vol. 9 948–959 (2013).
15. Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D. & Katz, L. C. Chapter 5: Synaptic Transmission. in *Neuroscience* (Sinauer Associates, 2001).
16. Meldrum, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr* **130**, 1007–1015 (2000).
17. Mayer, M. L., Westbrook, G. L. & Guthrie, P. B. Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* **309**, 261–263 (1984).

18. Dong, X., Wang, Y. & Qin, Z. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol. Sin.* **30**, 379–387 (2009).
19. Greger, I. H., Watson, J. F. & Cull-Candy, S. G. Structural and Functional Architecture of AMPA-Type Glutamate Receptors and Their Auxiliary Proteins. *Neuron* **94**, 713–730 (2017).
20. Hansen, K. B., Furukawa, H. & Traynelis, S. F. Control of assembly and function of glutamate receptors by the amino-terminal domain. *Mol. Pharmacol.* **78**, 535–549 (2010).
21. Herguedas, B. *et al.* Structure and organization of heteromeric AMPA-type glutamate receptors. *Science* **352**, aad3873 (2016).
22. Díaz-Alonso, J. *et al.* Subunit-specific role for the amino-terminal domain of AMPA receptors in synaptic targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 7137–7141 (2017).
23. Kamalova, A. *et al.* The Journal of Physiology AMPA receptor structure and auxiliary subunits. *J Physiol* **599**, 453–469 (2021).
24. Hollmann, M., Maron, C. & Heinemann, S. N-glycosylation site tagging suggests a three transmembrane domain topology for the glutamate receptor GluR1. *Neuron* **13**, 1331–1343 (1994).
25. Shepherd, J. D. & Huganir, R. L. The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 613–643 (2007).
26. Twomey, E. C., Yelshanskaya, M. V, Grassucci, R. A., Frank, J. & Sobolevsky, A. I. Channel opening and gating mechanism in AMPA-subtype glutamate receptors. *Nature* **549**, 60–65 (2017).
27. Lau, A. Y. & Roux, B. The Free Energy Landscapes Governing Conformational Changes in a Glutamate Receptor Ligand-Binding Domain. *Structure* **15**, 1203–1214 (2007).
28. Krieger, J., Lee, J. Y., Greger, I. H. & Bahar, I. Activation and desensitization of ionotropic glutamate receptors by selectively triggering pre-existing motions. *Neuroscience Letters* vol. 700 22–29 (2019).
29. DiGregorio, D. A., Rothman, J. S., Nielsen, T. A. & Silver, R. A. Desensitization properties of AMPA receptors at the cerebellar mossy fiber granule cell synapse. *J. Neurosci.* **27**, 8344–8357 (2007).
30. Pachernegg, S., Münster, Y., Muth-Köhne, E., Fuhrmann, G. & Hollmann, M. GluA2 is rapidly edited at the Q/R site during neural differentiation in vitro. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 69 (2015).
31. Brorson, J. R., Li, D. & Suzuki, T. Selective expression of heteromeric AMPA receptors driven by flip-flop differences. *J. Neurosci.* **24**, 3461–3470 (2004).
32. Pei, C., Mao, S. & Zhu, W. [Molecular diversity of rumen Archaea from Jinnan cattle]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **48**, 8–14 (2008).
33. Gan, Q., Salussolia, C. L. & Wollmuth, L. P. Assembly of AMPA receptors: Mechanisms

- and regulation. *J. Physiol.* **593**, 39–48 (2015).
34. Henley, J. M. & Wilkinson, K. A. Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **17**, 337–350 (2016).
  35. Haering, S. C., Tapken, D., Pahl, S. & Hollmann, M. Auxiliary subunits: shepherding AMPA receptors to the plasma membrane. *Membranes (Basel)*. **4**, 469–490 (2014).
  36. Pinggera, A., Watson, J. F. & Greger, I. H. AMPA Receptors. in *eLS* 635–644 (Wiley, 2020). doi:10.1002/9780470015902.a0029223.
  37. Bissen, D., Foss, F. & Acker-Palmer, A. AMPA receptors and their minions: auxiliary proteins in AMPA receptor trafficking. *Cell. Mol. Life Sci.* **76**, 2133–2169 (2019).
  38. Ishii, T., Stolz, J. R. & Swanson, G. T. Auxiliary Proteins are the Predominant Determinants of Differential Efficacy of Clinical Candidates Acting as AMPA Receptor Positive Allosteric Modulators. *Mol. Pharmacol.* **97**, 336–350 (2020).
  39. Payne, A. & Essem, J. Management of patients' physical health in an acute psychiatric unit. *Ir. J. Psychol. Med.* **25**, 127–130 (2008).
  40. Lemos, S. Regulation of AMPA receptors by type II-TARPs. (Ruhr University Bochum, 2017).
  41. Kato, A. S., Gill, M. B., Yu, H., Nisenbaum, E. S. & Brecht, D. S. TARPs differentially decorate AMPA receptors to specify neuropharmacology. *Trends in Neurosciences* vol. 33 241–248 (2010).
  42. Ben-Yaacov, A. *et al.* Molecular Mechanism of AMPA Receptor Modulation by TARP/Stargazin. *Neuron* **93**, 1126–1137.e4 (2017).
  43. Herguedas, B. *et al.* Architecture of the heteromeric GluA1/2 AMPA receptor in complex with the auxiliary subunit TARP  $\gamma$ 8. *Science* **364**, (2019).
  44. Miguez-Cabello, F. *et al.* AMPAR/TARP stoichiometry differentially modulates channel properties. *Elife* **9**, (2020).
  45. Kato, A. S. *et al.* Hippocampal AMPA Receptor Gating Controlled by Both TARP and Cornichon Proteins. *Neuron* **68**, 1082–1096 (2010).
  46. Nair, D. *et al.* Super-resolution imaging reveals that AMPA receptors inside synapses are dynamically organized in nanodomains regulated by PSD95. *J. Neurosci.* **33**, 13204–13224 (2013).
  47. Choquet, D. & Hossy, E. AMPA receptor nanoscale dynamic organization and synaptic plasticities. *Current Opinion in Neurobiology* vol. 63 137–145 (2020).
  48. Jackson, A. C. & Nicoll, R. A. The expanding social network of ionotropic glutamate receptors: TARPs and other transmembrane auxiliary subunits. *Neuron* **70**, 178–199 (2011).
  49. Menuz, K., Stroud, R. M., Nicoll, R. A. & Hays, F. A. TARP auxiliary subunits switch AMPA receptor antagonists into partial agonists. *Science* **318**, 815–817 (2007).
  50. Dohrke, J.-N., Watson, J. F., Birchall, K. & Greger, I. H. Characterizing the binding and



- function of TARP  $\gamma$ 8-selective AMPA receptor modulators. *J. Biol. Chem.* **295**, 14565–14577 (2020).
51. García-Nafría, J., Watson, J. F. & Greger, I. H. IVA cloning: A single-tube universal cloning system exploiting bacterial In Vivo Assembly. *Sci. Rep.* **6**, 1–12 (2016).
  52. Zivanov, J. N. New tools for automated high-resolution cryo-EM structure determination in RELION-3. *Elife* e42166 doi107554eLife42166 **9**, (2018).
  53. Dürr, K. L., Chen, L., Stein, R. A., Zorzi, R. D. & Gouaux, E. Structure and Dynamics of AMPA Receptor GluA2 in Resting, Pre-Open, and Desensitized States. *Cell* **158**, 778–792 (2014).
  54. Yelshanskaya, M. V., Saotome, K., Singh, A. K. & Sobolevsky, A. I. Probing Intersubunit Interfaces in AMPA-subtype Ionotropic Glutamate Receptors. *Sci. Rep.* **6**, (2016).