

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y
EMBRIOLOGÍA HUMANA

TESIS DOCTORAL

***"Cambios en el comportamiento de
proteínas receptoras del Sistema Nervioso
Central tras transfección de subunidades
específicas"***

Memoria presentada por Dña. Macarena Perán Quesada para
optar al grado de Doctor Europeo en ciencias Biológicas

Granada, 10 de Mayo de 2006

Dña. ANTONIA ARÁNEGA JIMÉNEZ, CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMIA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

HACE CONSTAR:

Que D^a Macarena Perán Quesada ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: "***Cambios en el comportamiento de proteínas receptoras del Sistema Nervioso Central tras transfección de subunidades específicas***" y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor Europeo ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 10 de Mayo de 2006.

Fdo. Antonia Aránega Jiménez

D. JUAN ANTONIO MARCHAL CORRALES PROFESOR TITULAR
DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD
DE JAÉN.

HACE CONSTAR:

Que D^a Macarena Perán Quesada ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: "***Cambios en el comportamiento de proteínas receptoras del Sistema Nervioso Central tras transfección de subunidades específicas***" y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor Europeo ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 10 de Mayo de 2006.

Fdo. Juan Antonio Marchal Corrales

Dña. HOURIA BOULAIZ, PROFESORA AYUDANTE DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMIA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

HACE CONSTAR:

Que D^a Macarena Perán Quesada ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: "***Cambios en el comportamiento de proteínas receptoras del Sistema Nervioso Central tras transfección de subunidades específicas***" y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor Europeo ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 10 de Mayo de 2006.

Fdo. Houria Boulaiz

El trabajo de investigación que se expone en la siguiente Tesis, ha sido realizado por Dña. Macarena Perán Quesada bajo la dirección de:

Dña. ANTONIA ARÁNEGA JIMÉNEZ

D. JUAN ANTONIO MARCHAL CORRALES

Dña. HOURIA BOULAIZ

Los resultados de esta tesis han sido publicados parcialmente en:

Perán M, Hicks BW, Peterson NL, Hooper HT, Salas, R. Lateral mobility and anchoring of recombinant GABAA receptors depend on subunit composition. *Cell Mot Cyt.* 2001; 50:89-100.

Perán M., Hooper H.T., Boulaiz H, Marchal JA, Aranega A y Salas R. The M3/M4 cytoplasmic loop of the $\alpha 1$ subunit restricts GABA_ARs lateral mobility. A study using Fluorescence Recovery After Photobleaching
Cellular Motility and the Cytoskeleton : En revision

ÍNDICE

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN.....	2
1. DINÁMICA DE MEMBRANA NEURONAL.....	3
1.1. La membrana neuronal.....	3
1.2. Modelos de confinamiento de proteínas de membrana.....	4
1.2.1. Modelo de corral.....	4
1.2.2. Localización de zonas con altas concentración de proteínas.....	5
1.2.3. Localización de dominios lipídicos.....	5
1.3. Influencia de la estructura terciaria de una proteína en su movilidad lateral.....	6
1.3.1. Región citoplasmática.....	7
1.3.2. Región transmembrana.....	8
1.3.3. Región extracelular.....	8
1.4. Anclaje de proteínas en la membrana neuronal.....	9
1.4.1. Distribución superficial de receptores de neurotransmisores.....	9
1.4.1.1. Distribución de los receptores de glicina.....	10
1.4.1.2. Distribución de los receptores de glutamato.....	10
1.4.1.3. Distribución de los receptores de GABA.....	11
2. SEGUIMIENTO DE PARTICULAS INDIVIDUALES (SPT).....	12
2.1. Introducción a la técnica de SPT.....	12
2.2. Detección de diferentes dominios de membrana mediante SPT.....	14
2.3. Detección de diferentes modelos de movimiento de proteína de membrana mediante SPT.....	19
2.4. Ventajas del uso de SPT frente a FRAP.....	21
3. TRANSFECCIÓN GÉNICA.....	22
3.1. Métodos de transfección.....	22
3.1.1. Métodos virales.....	23
3.1.1.1. Retrovirus.....	24
3.1.1.2. Adenovirus.....	26
3.1.1.3. Virus asociados a adenovirus.....	27
3.1.1.4. Herpesvirus.....	28
3.1.1.5. Virus de la vacuna.....	28

3.2. Principales características de los sistemas no víricos utilizados como vectores en terapia génica.....	29
3.2.1. Métodos mecánicos y fisicoquímicos.....	29
3.2.1.1 Microinyección.....	30
3.2.1.2. Bombardeo de partículas.....	30
3.2.1.3. Electroporación.....	31
3.2.1.3. Rayos láser.....	31
3.2.1.4. Precipitación con fosfato cálcico.....	32
3.2.1.5. Liposomas.....	32
3.3. Transfección de neuronas.....	34
4. CONSTRUCCIÓN DE UN ADENOVIRUS RECOMBINANTE.....	36
4.1. Descripción del Adenovirus.....	36
4.1.1. Características estructurales de los adenovirus y patogenia....	36
4.1.2. Ciclo vital del Adenovirus.....	37
4.1.3. Efecto del tipo salvaje de adenovirus en células humanas.....	39
4.2. Potenciales aplicaciones de los adenovirus recombinantes.....	40
4.3. Sobre expresión de proteínas recombinantes en células humanas.....	41
4.4. El uso del adenovirus como método de transfección.....	43
4.5. Producción de animales transgénicos.....	45
4.6. Ventajas del uso de Adenovirus Recombinantes como método de transfección.....	46
4.7. Construcción de Adenovirus Recombinantes.....	48
5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO REALIZADO.....	52
II. OBJETIVOS.....	53
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	55
1. METODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	56
1.1. Construcción de las subunidades quiméricas.....	56
1.1.1. Construcción de la subunidad quimérica alfa1-CH.....	56
1.1.2. Construcción de la subunidad quimérica alfa1-CD.....	57
1.2. Generación de bacterias competentes.....	58
1.3. Confección de placas de agar/ampicilina.....	59
1.4. Transformación bacteriana.....	59

1.5. Cultivo bacteriano a gran escala.....	60
1.6. Extracción y purificación del ADN.....	60
1.7. Análisis de los plásmidos recombinantes.....	61
1.8. Análisis mediante digestión.....	61
1.9. Análisis mediante PCR.....	61
1.10. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	62
1.10.1 Preparación del gel de agarosa.....	62
1.10.2. Electroforesis.....	62
1.11. Obtención de ADN tras electroforesis en un gel de agarosa.....	63
2. CONSTRUCCIÓN DEL ADENOVIRUS RECOMBINANTE.....	64
2.1. Introducción de sitios de corte para las enzimas BglII y PmeI en el ADN de las quimeras.....	64
2.2. Purificación de los productos obtenidos de la PCR.....	65
2.3. Digestión de los productos de PCR.....	66
2.4. Obtención del vector.....	66
2.5. Digestión del vector pQBI-AdCMV5-BFP con las enzimas de restricción BglII y PMeI.....	67
2.6. Digestión de las quimeras de alfa1 con las enzimas de restricción BglII y PMeI.....	67
2.7. Clonación del ADN en el vector de transferencia del adenovirus.....	68
2.8. Transformación de bacterias Escherichia Coli competentes con la ligación adenovirus vector+ ADN quimeras.....	69
2.9. Verificación de los producto de ligación vector + quimera alfa1.....	69
2.10. Cultivo de las células empaquetadoras QBI-293A.....	70
2.11. Linealización del plásmido adenoviral+ADN iserto.....	70
2.12. Transfección de las células QBI-293A con el vector de transferecia recombinante.....	70
2.13. Pasaje de las células 293 tras la transfección.....	71
2.14. Cubrir las células transfectadas con agarosa.....	71
2.15. Producción del stock primario de adenovirus.....	72

2.16. Escrining del adenovirus recombinante mediante PCR.....	73
2.17. Pre-amplificación del adenovirus.....	73
2.18. Amplificación del adenovirus.....	73
2. 19. Purificación de las partículas virales mediante doble gradiente de cloruro de cesio.....	74
2.19. 1. Gradiente discontinuo.....	74
2.19.2. Gradiente continuo.....	75
2.20. Cálculo de título de partículas virales mediante el método: dosis de infección del cultivo (DIC50).....	75
2.21. Dilución seriada del virus.....	75
2.22. Preparación de las células.....	76
2.23. Distribución de la dilución viral.....	76
2.24. Lectura de las placas.....	76
2.25. Infección de las células con el adenovirus.....	77
3. CULTIVOS CELULARES.....	78
3.1. Líneas Celulares.....	78
3.2. Cultivo de líneas celulares.....	78
3.3. Congelación de las líneas celulares.....	79
3.4. Descongelación de las líneas celulares.....	79
4. TRANSFECCIÓN DE VECTORES EN CÉLULAS EUCARIÓTICAS.....	80
4.1. Método de transfección.....	80
4.1.1. Transfecciones mediadas por liposomas.....	80
4.1.2. Electroporación.....	82
4.1.3. Técnica de precipitación de calcio-fosfato.....	83
5. SEGUIMIENTO DE PARTICULAS INDIVIDUALES (SPT).....	84
5.1. Calibración del microscopio.....	85
5.2. Procedimiento.....	85
IV. RESULTADOS.....	87
1. COMPARACIÓN DE LA EFICIENCIA DE DIFERENTES MÉTODOS DE TRANSFECCCIÓN.....	88
1.1. Medida de la eficiencia de transfección de diferentes métodos en células no neuronales.....	90

1.2. Medida de la eficiencia de transfección de diferentes métodos en células neuronales.....	94
2. CONSTRUCCIÓN DEL ADENOVIRUS RECOMBINANTE.....	95
2.1. Introducción de sitios de corte para las encimas BglII y PmeI en el ADN de las quimeras.....	96
2.2. Digestión de los productos de PCR.....	97
2.3. Digestión y purificación en electroforesis en gel de agarosa de las subunidades alfa1 quiméricas.....	99
2.4. Vector viral.....	100
2.5. Digestión y purificación en electroforesis en gel de agarosa del plásmido recombinante pQBI-AdCMV5-BFP.....	101
2.6. Purificación del vector pQBI-AdCMV5-BFP por electroforesis en gel de agarosa.....	102
2.7. Clonación del ADN en el vector de transferencia del adenovirus.....	103
2.8. Preparación del vector de transferencia recombinante.....	105
2.9. Transformación de bacterias competentes y obtención de cepas con el resultado de la ligación adenovirus vector+ADN inserto.....	105
2.10. Linealización del plásmido adenoviral+ADN inserto.....	106
2.11. Obtención de colonias del adenovirus recombinante mediante transfección de las células QBI-293A con el vector de transferencia recombinante junto al ADN viral.....	107
2.12. Pre-amplificación del adenovirus.....	108
2.13. Amplificación del adenovirus.....	109
2.14. Cálculo de título de partículas virales mediante el método: dosis de infección del cultivo (DIC50).....	110
2.15. Infección de las células con el adenovirus.....	113
3. ESTUDIOS DE SINGLE PARTICLE TRACKING (SPT) EN CÉLULAS COS7.....	118
3.1. Estudios de SPT de complejos compuestos unicamente por la subunidad beta3.....	118
3.2. Estudios de SPT de complejos compuestos por la subunidad alfa1 y la subunidad beta3.....	125

4. ESTUDIOS DE SINGLE PARTICLE TRACKING (SPT)	
EN NEURONAS.....	131
4.1. Estudios de SPT al transfectar las células granulares de cerebelo de rata con la subunidad quimera de alfa1CH.....	132
4.2. Estudios de SPT al transfectar las células granulares de cerebelo de rata con la subunidad quimera de alfa1CD.....	138
V. DICUSSION.....	144
4.1. Evaluation of different transfection techniques.....	145
4.1.1. Liposome mediated transfection.....	146
4.1.2. Calcium-phosphate precipitation technique.....	147
4.1.3. Electroporation.....	148
4.2. Adenovirus transfection. Potential uses in neurological disorders.....	149
4.3. Applications of the recombinant adenovirus in the study of receptors dynamics.....	152
4.4. Studies of GABA receptors dynamics by SPT in COS7 cells.....	154
4.5. Studies of GABA receptors dynamics by SPT in neurons.....	157
4.6. Truncated alpha1 were able to assembly into GABAAR but showed a differential distribution pattern.....	160
4.6.1. Localization of the chimera alfa1 subunits on transfected neurons.....	162
4.7. New model of receptor dynamic.....	163
VI. CONCLUSIONES.....	167
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	170
VIII. ANEXO.....	190

RESUMEN

Los receptores del neurotransmisor ácido gama-amino butírico (GABA), juegan un papel fundamental en la regulación de la excitabilidad cerebral. Desde el punto de vista terapéutico su relevancia viene determinada por el hecho de que su función es regulada por los principales medicamentos y fármacos psicotrópicos.

Se ha realizado la construcción de un adenovirus recombinante con subunidades quiméricas de los receptores GABA. El uso de este adenovirus como vehículo de transfección ha permitido la introducción de estos genes modificados del receptor GABA en células neuronales, y el estudio de los receptores recombinantes expresados. La posibilidad de transfectar células no replicantes mediante vectores adenovirales abre una nueva etapa en el estudio de los procesos que intervienen en el funcionamiento del Sistema Nervioso Central. La transfección de neuronas in situ o en cultivos primarios, permite estudiar los procesos neuronales en células nerviosas. Además esto permitirá contar con una herramienta eficaz para estudiar de forma controlada la acción de fármacos selectivos sobre dichos receptores, así como poder buscar nuevas moléculas terapéuticas diseñadas específicamente para modular estas dianas.

Capítulo I
INTRODUCCIÓN

1. DINÁMICA DE MEMBRANA NEURONAL

1.1. La membrana neuronal

Las sinapsis son dominios altamente especializados dentro de la membrana de las neuronas. Para que este complejo mecanismo de comunicación sea exitoso, debe existir un perfecto acoplamiento entre el neurotransmisor secretado y su correspondiente receptor postsináptico (Craig y Bourin, 2001).

El modelo de mosaico fluido que describe a las membranas celulares como un mar de lípidos en el que los componentes proteicos de las mismas flotan a la deriva, parece pues, no ajustarse a la realidad de la célula nerviosa. No es lógico suponer que estas piezas fundamentales para la organización celular y la transmisión de información se desplacen lateralmente, embebidas en la bicapa de fosfolípidos, sin otro tipo de restricción en su difusión que la viscosidad propia de la membrana (Feder y cols., 1996, Nagle, 1992). Por el contrario, las proteínas sinápticas deben estar sujetas a influencias que impidan y restrinjan su movilidad. Deben existir mecanismos que permitan compartimentalizar la membrana plasmática para concentrar a determinadas proteínas en puntos estratégicos de control y para impedir que la función de las mismas se vea dificultada por su dispersión sobre la membrana (Gaus y cols., 2006).

Para estudiar la difusión lateral de proteínas de membrana o su confinamiento en regiones específicas hay que tener en cuenta las características estructurales tanto, y valga la redundancia, de las proteínas como de la membrana.

A continuación se resumen los diferentes modelos que describen las características estructurales y de composición que determinan la formación de dominios diferentes dentro de una membrana. Posteriormente se detallara como la estructura terciaria de una proteína puede condicionar su dinámica dentro de la membrana.

1.2. Modelos de confinamiento de proteínas de membrana

Tres modelos no excluyentes, han sido propuestos para explicar el confinamiento transitorio de proteínas de membrana dentro de dominios o regiones específicas de la membrana neuronal (Sheets y cols., 1995), brevemente:

1.2.1. Modelo de corral

Este modelo de membrana esta basado en compartimentos o dominios de membrana creados por las proteínas del citoesqueleto espectrina y ankirina. Estas proteínas dividen la membrana en pequeños dominios de unos $0,1-1 \mu\text{m}^2$ que proporcionan una barrera a la libre difusión de las proteínas de membrana. Los dominios citoplásmicos de las proteínas de membrana interaccionan estéricamente con la red citoesquelética bajo la superficie celular.

Es razonable suponer que las proteínas de la membrana con dominios citoplásmicos grandes experimentarán más restricciones en su movilidad que las proteínas con regiones citoplásmicas pequeñas. La composición protéica del citoesqueleto determina sus propiedades dinámicas ya que dichas proteínas pueden experimentar cambios que alteren los "corrales" citoesqueléticos. De esta forma, cambios en el

citosqueleto propician que las proteínas de la membrana puedan escapar de un dominio y moverse a un compartimiento adyacente.

1.2.2. Localización de zonas con altas concentración de proteínas.

Las altas concentraciones locales de proteínas, limitadas directamente o indirectamente por el citoesqueleto, pueden actuar como obstáculos a la difusión libre de las proteínas de membrana (Kenworthy y cols., 2004). Aquí, las proteínas que difunden libremente, interaccionan estéticamente o específicamente con interacciones químicas directas con las otras proteínas. Estas proteínas obstáculo pueden formar grandes redes vía interacciones cis, con lo que forman una barrera física para la difusión. Tal mecanismo puede explicar el confinamiento transitorio de las proteínas GPI-ancladas (GPI: glicosil-fosfatidil-inositol), las cuales no pueden interaccionar directamente con el entramado citosquelal.

1.2.3. Localización de dominios lipídicos

Diferencias locales en la composición lipídica de la bicapa, que formen microdominios de alta viscosidad, pueden también provocar el confinamiento de las proteínas en dichos dominios (Murase y cols., 2004). De hecho por medio de experimentos bioquímicos y de física de fluidos se han detectado la existencia de al menos dos tipos de "ambientes de fluido" diferentes en una membrana dada (Schütz y Kada 2000; Fujiwara y cols., 2002). Se trata de regiones en la membrana que presentan diferentes características físicas, aunque la barrera entre ambas, sus tamaños relativos o las características de su interfase de separación son parámetros que aún no han sido totalmente determinados (Dietrich y cols., 2002).

1.3. Influencia de la estructura terciaria de una proteína en su movilidad lateral

Para estudiar de que depende la movilidad lateral de una proteína se deben considerar tres regiones de las mismas: la región citoplasmática; la región transmembrana y la región extracelular (Sheetz, 1993). En la Figura 1 se muestra una representación de cuatro modelos de proteínas. Cada uno de ellos se diferencia en el tamaño de sus regiones protéicas, el modelo A de proteína presenta una región transmembrana formada por una única helice, mientras que son seis las hélices transmembrana en el modelo de proteína C.

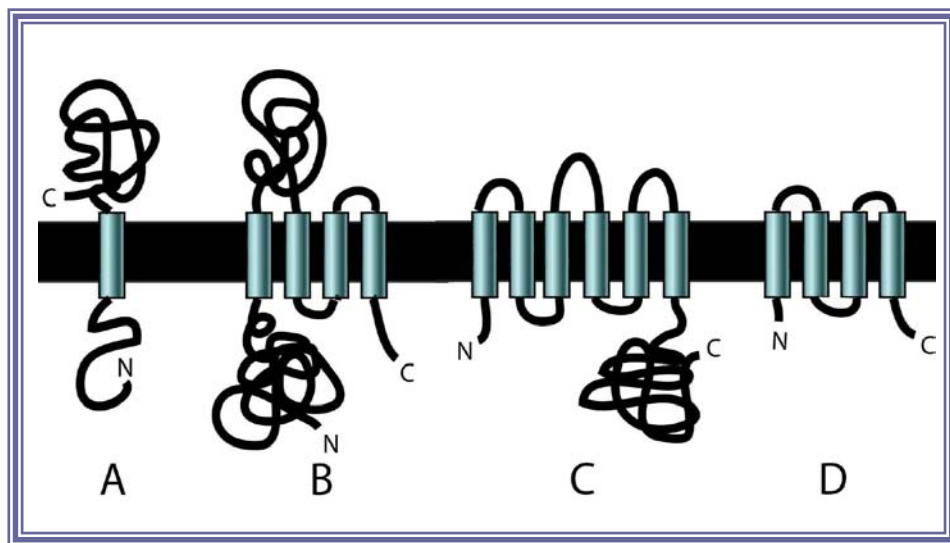


Figura 1. Representación de 4 modelos de proteína diferentes según su región citoplasmática; su región transmembrana y su región extracelular

Las diferencias son notorias, así mismo, en la región extracelular, algunas proteínas (ejm A y B) poseen regiones extraplasmáticas extensas mientras que otras como es el caso del modelo C y D carecen de ellas. Del mismo modo, la conformación final de las proteínas difiere en función de su región citoplasmática o intracelular.

La influencia que ejercen estas regiones sobre la movilidad lateral varía entre distintos tipos de proteínas y entre distintas líneas celulares.

1.3.1. Región citoplasmática

En algunos casos el factor que afecta de forma más determinante a la difusión lateral es el dominio citoplasmático y su interacción con el citoesqueleto. Se ha comprobado como al truncar el dominio citoplasmático de receptores del complejo de histocompatibilidad MHC II o de la proteína de la banda 3 de eritrocitos, el coeficiente de difusión de ambos complejos aumentaba (Edidin, 1990; Zhang y cols., 1993). Este resultado, sin embargo, no es extrapolable a todo tipo de proteínas, se ha observado como escisiones severas de la región citoplasmática de proteínas de la familia de GPI parecen no tener efecto alguno en sus coeficientes de difusión (Zhang y cols., 1993). En este caso, o el citoesqueleto ejerce muy poco control sobre la movilidad o su control es indirecto y no vía interacción con la región citoplasmática de la proteína. Este control indirecto puede estar mediado por proteínas mediadoras o "scalafon" que serían las que interactuarían directamente con el esqueleto celular (Sheets y cols., 1995).

1.3.2. Región transmembrana

La mayoría de las proteínas de membrana poseen dominios citoplásmicos y extracelulares grandes, pero una única hélice constituye su región transmembrana. Se ha evaluado el efecto combinado de la obstrucción (Saxton, 1990; Yi y cols., 2006) y de las interacciones hidrodinámicas con obstáculos, mostrándose que concentraciones bajas de proteínas inmóviles reducen perceptiblemente el coeficiente de difusión de proteínas móviles (Dodd y cols., 1995; Bussell y cols., 1995a). Las proteínas interactúan vía su región transmembrana con proteínas obstáculo, cuanto mayor sea dicha región las interacciones serán más fuertes y duraderas (Bussell y cols., 1995b).

1.3.3. Región extracelular

Existen varias evidencias que apuntan a la importancia de la región extracelular en el control de la difusión lateral de las proteínas (Edidin, 1994; Sheetz, 1993; Zhang y cols., 1993). Dado el gran tamaño de los dominios extracelulares, los efectos de la obstrucción por medio de interacciones con otras proteínas de membrana, son probablemente responsables de la disminución de la difusión lateral de las mismas. Proteínas que presenten una mayor área extracelular, presentará una zona de posible interacción con otras proteínas de membrana, que pueden ser a su vez móviles o no, mayor que aquellas de regiones extracelulares más reducidas (Mouritsen y cols., 1993).

1.4. Anclaje de proteínas en la membrana neuronal

El agrupamiento de proteínas en dominios discretos y funcionalmente significativos es una característica importante de la biología celular de la neurona. Se precisan mecanismos específicos de restricción de la movilidad que aseguren el anclaje total o inmovilización de las proteínas neuronales en puntos estratégicos de la membrana. En la membrana neuronal esta restricción a la movilidad de las proteínas que componen los receptores de membrana, se consigue mediante la conjunción de elementos estructurales de membrana y de las características intrínsecas de la proteína.

Claros ejemplos del anclaje de proteínas de membrana en neuronas nos vienen de las observaciones de los canales de Ca^{2+} , los cuales deben localizarse en dominios concretos de las espinas dorsales dendríticas, para poder producir una amplificación efectiva de la señal eléctrica (Cohen y cols., 1991). Del mismo modo, el secuestro de los receptores de glutamato en las espinas dorsales dendríticas (Baude y cols., 1995) son ejemplos de cómo proteínas de membrana se localizan y se mantienen en dominios discretos de la membrana neuronal.

1.4.1. Distribución superficial de receptores de neurotransmisores

Los receptores de neurotransmisor dependen de variados y complejos mecanismos que regulan su distribución superficial. Algunos receptores de neurotransmisor por ejemplo, requieren de su activación previa para agruparse en los sitios post-sinápticos, (Kirsch, 1999).

1.4.1.1. Distribución de los receptores de glicina

La agrupación de los receptores de glicina en las terminaciones pre-sinápticas se debe a su interacción con una proteína de anclaje denominada gefirina. La concentración de esta proteína de anclaje en dichos dominios esta regulada a su vez por la entrada de calcio (Kirsch y Betz, 1998). Estudios *in vitro* sugieren que la proteína gefirina interacciona con la proteína tubulina (Kirsch y cols., 1991), por lo que la localización post-sináptica de los agrupamientos de gefirina/receptores de glicina, parece estar mediada en último termino por los microtubulos y los microfilamentos (Kirsch, 1999). Se ha comprobado que es la subunidad beta del receptor de glicina la que media en la unión del receptor con la proteína gefirina, y que lo hace vía un motivo específico de su lazo citoplasmático, (Meyer y cols., 1995). Dentro de la proteína gefirina son los residuos hidrofóbicos de los aminoácidos situados en un lado de su hélice anfipática los responsables finales de su unión con el citosqueleto (Kneussel y cols., 1999).

1.4.1.2. Distribución de los receptores de glutamato

Diversas proteínas de anclaje se han demostrado que interaccionan con cada uno de los tres receptores de glutamato.

Los receptores ionotrópicos de glutamato, y el receptor metabotrópico de glutamato, son agrupados en el lado post-sináptico de las sinapsis excitatorias por medio de dominios de interacción denominados PDZ (así llamados por las proteínas en las cuales estos dominios fueron identificados: Psd-95, discos grandes y Zo-1). Estos dominios PDZ son lazos de cerca de 90 aminoácidos que median interacciones proteína-proteína por medio de la región C-terminal de

las mismas (Dong y cols., 1997; Sheng, 1997; Brakeman y cols., 1997).

La interacción entre los receptores de glutamato y las proteínas que los anclan, parece estar mediada por dominios intracelulares de alguna de las subunidades que forman el complejo del receptor (Ehlers y cols., 1995; Kornau y cols., 1995; Dong y cols., 1997).

1.4.1.3. Distribución de los receptores de GABA

No se conocen aún en profundidad cuales son los mecanismos que mantienen a los receptores GABA en los dominios sinápticos de la neurona, aunque varios grupos de investigación están implicados en su estudio. Se han identificado dos proteínas que parecen mediar la localización y anclaje en la membrana postsináptica de receptores GABA compuestos por determinadas subunidades. Estas proteínas son por una parte la gefirina, ya que parece interactuar con la subunidad gamma de los receptores de GABA (Essrich y cols., 1998), y por otra, la proteína GABAAR-asociada (GABARAP), que interactúa a su vez con la subunidad gamma de receptores de GABA en neuronas corticales (Wang y cols., 1999).

Para caracterizar dichas proteínas y su posibles interacciones con los receptores de GABA se han utilizado estudios de cross-linking químico (Burden y cols., 1983); marcaje inmunofluorescente (Phillips y cols., 1991); solubilidad en Tritón X-100; inmunobloting (Phillips et al, 1993); y el uso del sistema doble híbrido en levadura (Wang et al, 1999). Estos métodos, sin embargo, se acercan al problema desde una reconstitución *in vitro* del sistema, y no revelan si estas asociaciones contribuyen al anclaje funcional de los complejos del receptor *in vivo*.

Por otra parte, se conoce que las interacciones de las proteínas de membrana con el citoesqueleto son muy complejas, implicando interacciones o mecanismos de restricción o de compartimentación, que están por encima de interacciones a los niveles estructurales secundarios o terciarios, y que no se revelan comúnmente en sistemas reconstituidos.

Una aproximación más realista de la dinámica de los receptores y los mecanismos de anclaje de los mismos se alcanza al emplear la técnica de Seguimiento de Partículas Individuales (Single Particle Tracking, SPT). Esta técnica permite la medida de la movilidad lateral de los componentes de la membrana y se utiliza para seguir el movimiento de proteínas sobre la superficie de células vivas en tiempo real. SPT permite por tanto, una medida directa de los índices de difusión lateral de dichas proteína para caracterizar las fuerzas e interacciones de las que puede depender su localización en determinado dominios celulares.

2. SEGUIMIENTO DE PARTICULAS INDIVIDUALES (SPT)

2.1. Introducción a la técnica de SPT

La técnica de seguimiento individual de partículas (SPT) se utiliza para realizar un estudio no invasivo de las características de la membrana. SPT se lleva a cabo mediante microscopía de video computerizada. Esta sofisticada técnica se utiliza para seguir el movimiento de proteínas o de lípidos en la membrana de células vivas. Las moléculas individuales o agrupadas en pequeños racimos se observan, con una resolución espacial de diez nanómetros y una

resolución temporal de diez milisegundos (Saxton, 1997; Moerner y cols., 2003).

En experimentos de SPT se le une a la proteína de membrana, mediante inmunocitoquímica, una esfera fluorescente y se monitoriza su desplazamiento por medio de video microscopia (Saxton and Jacobson, 1997). Si el movimiento de la partícula marcada es libre, la trayectoria que describe la molécula seguirá un modelo de desplazamiento Browniano en dos dimensiones. Si por el contrario, la proteína marcada encuentra una estructura que inhiba su movimiento, entonces la trayectoria descrita por la misma se desviará de un camino al azar (Saxton and Jacobson, 1997). Ciertos lípidos (colesterol, fosfolípidos saturados, etc.) y algunas proteínas (GPI-ligadas, etc.), propician la creación de dominios de membrana con movilidades más restringidas (Pralle y cols., 2000; Anderson y cols., 2002).

Por medio de SPT se puede determinar que mecanismo o mecanismos están implicados en el confinamiento de una proteína de membrana concreta. Así por ejemplo, se llega a elucidar si existen proteínas móviles o inmóviles que puedan provocar una obstrucción en el libre movimiento de los demás complejos de la membrana. Se puede comprobar así mismo si esta ocurriendo una unión transitoria con elementos de membrana que sean móviles o inmóviles, o si por el contrario existe un confinamiento por "corrales" citoesqueléticos, o un confinamiento u obstrucción por la matriz extracelular, o bien interacciones hidrodinámicas. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que clarificar que mecanismo es en última instancia el responsable de la localización de las proteínas de membrana es una tarea ardua, ya

que estos suelen actuar en concomitancia y no de forma aislada (Edidin M, 1994).

Resumiendo, esta técnica permite el estudio de la dinámica de los componentes de las membranas celulares vivas (Edidin M, 1994; Webb y cols., 1981), y se utiliza para responder a preguntas como las siguientes:

- a) ¿Como se mueven las partículas en la superficie de la célula?
- b) ¿En qué medida lo hacen?
- c) ¿Puede el movimiento de ciertas partículas desviarse de una difusión pura?
- d) ¿Cómo se controla ese movimiento, y cuál es su función?
- e) ¿Cómo se organiza la superficie de la célula?
- f) ¿En qué medida se desvían las membranas del modelo de mosaico fluido? (Feder y cols., 1996, Nagle, 1992)
- g) ¿Cómo se organizan las estructuras en la superficie de la célula?
- h) ¿La compartimentación previene la interferencia entre diferentes receptores? (Edidin M, 1994)
- i) ¿Qué control regional o global existe sobre la dinámica de la membrana celular? (Sheets y cols., 1995).

2.2. Detección de diferentes dominios de membrana mediante SPT

La organización estructural de una membrana dada puede ser determinada estudiando la difusión de una proteína marcada mediante SPT. La Figura 2 nos muestra una representación de cuatro posibles membranas celulares que contienen de uno a varios dominios, los

cuales presentan características diferentes. Estos dominios se han caracterizado por medio del seguimiento individual de proteínas de membrana marcadas. Se asume que los límites que separan estos dominios son impermeables. Si existe únicamente un dominio, entonces la proteína marcada experimentará un movimiento browniano o al azar a lo largo de la membrana (Fig. 2A). En presencia de más de un dominio de membrana, la proteína marcada podría quedar atrapada dentro de un dominio pequeño apareciendo como inmóvil. Si las proteínas marcadas se localizan fuera de los dominios de tamaño finito, el movimiento de las mismas se describirá como un movimiento browniano en presencia de obstáculos (Saxton, 1993, Saxton, 1994) (Fig. 2B). En el panel C se representa un dominio móvil en el que ha quedado atrapada la proteína marcada, el coeficiente de difusión de dicha proteína viene determinado por la velocidad a la que difunde el dominio (Fig. 2C). También la proteína podría quedar atrapada dentro de un dominio de breve duración, estos son dominios inestables que suelen llegar a desaparecer (Fig. 2D).

Los modelos de organización de membrana que se han propuesto de este modo describen una membrana que está formada por diferentes dominios o "ambientes". La clasificación de dichos dominios viene determinada por los coeficientes de difusión lateral que la proteínas experimentan, el estar incluidas o no en ellos, o al interactuar de forma indirecta con los mismos. Se han distinguido dentro de una membrana celular, por medio de experimentos de SPT, cuatro posibles dominios clasificados del siguiente modo (Anderson y Jacobson, 2002, Kenworthy y cols., 2004):

- a) Dominio estático
- b) Dominio móvil
- c) Dominio variable
- d) Dominios permeables

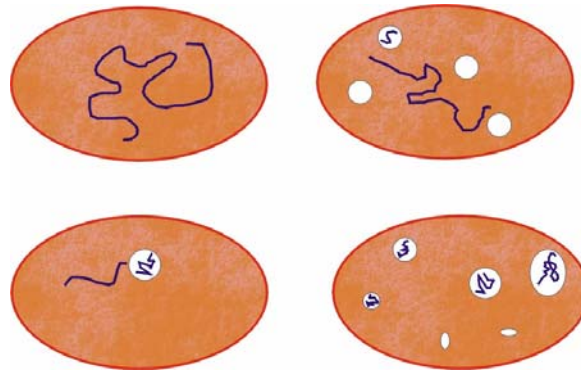


Figura 2. Representación de dominios de membrana y su interacción con proteínas marcadas. **Panel A:** representación de una membrana con un único dominio, la proteína marcada describe una trayectoria al azar (línea azul) dentro de este gran dominio. **Panel B:** representación de una membrana con varios dominios pequeños (blanco). Se representa mediante una línea azul la trayectoria de dos proteínas marcadas. Una de ellas está atrapada dentro de uno de los dominios estáticos e impermeables (blanco). La otra proteína difunde por la membrana celular y es excluida de los dominios blancos. **Panel C:** representación de una membrana con un dominio móvil e impermeable (blanco), su trayectoria viene representada por la línea azul. Una proteína marcada (azul) se encuentra atrapada dentro del dominio móvil. **Panel D:** Se representa una membrana con varios dominios dinámicos y de breve duración (blanco). Diferentes proteínas marcadas (líneas azules) han quedado atrapadas dentro de los dominios.

a) Dominios estáticos

Si una proteína marcada queda atrapada dentro de un dominio estático, y se realizan observaciones en un intervalo de tiempo corto, la difusión que experimenta dicha proteína puede aparecer como browniana. Al aumentar el tiempo de observación, y al llegar la proteína al límite del dominio, el coeficiente de difusión alcanzará y se mantendrá en un nivel constante. Mediante SMT se puede resolver el tamaño de los dominios estáticos de membrana (Ober y cols., 2004, Vrljic y cols., 2002).

b) Dominios móviles

Si una proteína marcada se localiza dentro de un dominio móvil, el coeficiente de difusión medido será la suma del coeficiente de difusión de la proteína marcada y el coeficiente de difusión del dominio (Vrljic y cols., 2002). Para determinar la existencia y las características de un dominio móvil, se debe analizar el movimiento relativo de dos proteínas marcadas que difunden dentro del mismo dominio. Si ambas proteínas marcadas (representadas por círculos de distinto color en Figura 3) quedan atrapadas dentro de un mismo dominio, la distancia que las separa no aumentará de la misma manera que si ambas proteínas estuvieran difundiendo aleatoriamente sobre la superficie celular.

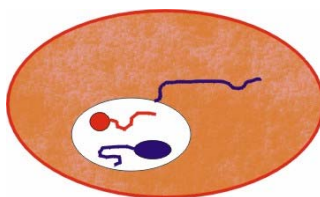


Figura 3. Se representa un dominio móvil (blanco) con una trayectoria al azar (línea azul). Dentro del dominio móvil dos proteínas marcadas (círculos) experimentan sendas trayectorias (roja y azul)

c) Dominios variables

En este caso los dominios no permanecen estables sino que van fluctuando y variando de tamaño, pudiendo incluso desaparecer. Las características de las trayectorias descritas por las proteínas marcadas serán muy similares a las obtenidas en dominios estables. La existencia de estos dominios es difícil de confirmar, ya que debe existir una diferencia de viscosidad suficiente que determine diferencias en la difusión lateral de las proteínas marcadas, y a su vez esta diferencia de viscosidad no debe ser constante (Saffman y Delbruck, 1975).

d) Dominios permeables

Este es el caso de los dominios que poseen barreras permeables. Así, las proteínas pueden entrar y salir de un dominio permeable libremente. Al entrar en dominios de diferente viscosidad dichas proteínas experimentarán cambios en el coeficiente de difusión lateral, pero no quedarán atrapados en ellos (Schütz y cols., 2000). En la Figura 4, se muestra una representación de este tipo de dominios.

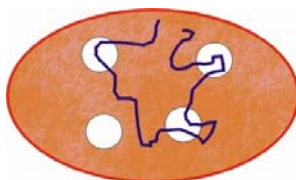


Figura 4. Representación de membrana con dominios permeables. Se representan 4 dominios (blanco) permeables, la trayectoria (línea azul) seguida por una proteína marcada atraviesa libremente por 3 dominios siguiendo un movimiento al azar.

2.3. Detección de diferentes modelos de movimiento de proteína de membrana mediante SPT

En el capítulo anterior se ha hecho referencia a la utilidad de la técnica de SPT para clasificar diferentes dominios o ambientes dentro de una membrana. El movimiento de proteínas de membrana marcadas se monitorizaba para descubrir, como cambios en su coeficiente de difusión venían impuestos por regiones dentro de la membrana con diferente viscosidad. Otra utilidad de la técnica de SPT es determinar la dinámica intrínseca de las proteínas y clasificar el movimiento de las mismas según su composición molecular.

Diferentes proteínas experimentan diferentes movibilidades dentro de una misma membrana, que pueden determinarse mediante el uso de SPT. En un experimento de SPT, la trayectoria de una partícula dada se mide por pares de puntos. Para unificar el resultado y reducir el ruido experimental, se calcula el cuadrado de la media de la suma de cada par de puntos que componen la trayectoria, obteniéndose así el valor de la media del cuadrado del desplazamiento (MSD).

La MSD para un intervalo de tiempo dado, se define pues, como la media de todos los pares de puntos independientes que componen la trayectoria en ese intervalo de tiempo, es decir, todos los pares de puntos que se registran en el tiempo dado (Qian y cols., 1991).

El valor de MSD para distintas partículas es muy diferente y permite, por lo tanto, clasificar los movimientos que describen diferentes proteínas de membrana en diferentes modelos de difusión (D), véase la Figura 5 y 6.

- a) Difusión dirigida (proteínas muy móviles, $D > 1$)
- b) Difusión pura (proteínas móviles, $D=1$)
- c) Difusión con obstáculos (proteínas confinadas, $D < 1$)
- d) Proteínas inmóviles (proteínas ancladas, $D=0$)

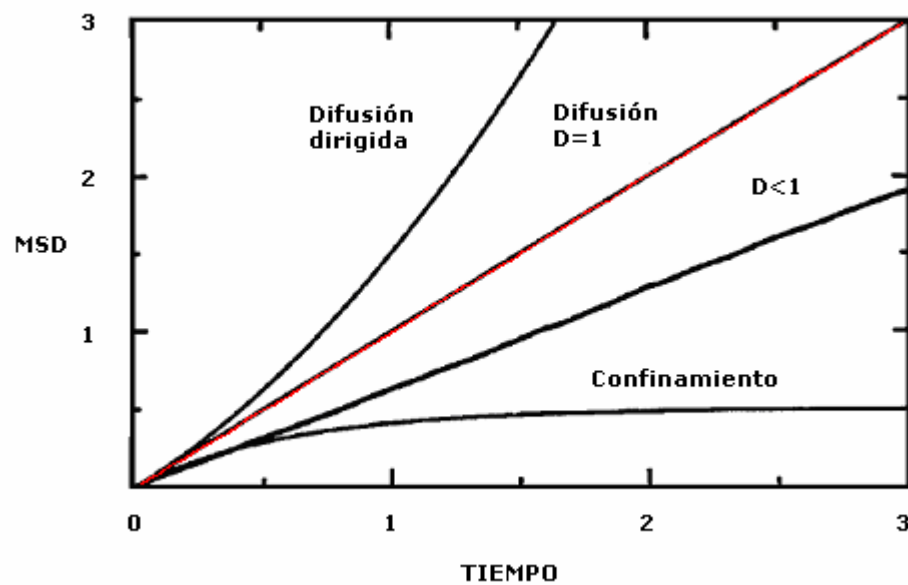


Figura 5. MSD representado en función del tiempo para cuatro proteínas diferentes que experimentan difusión dirigida; difusión pura ($D=1$); difusión en presencia de obstáculos ($D < 1$) y confinamiento (C).

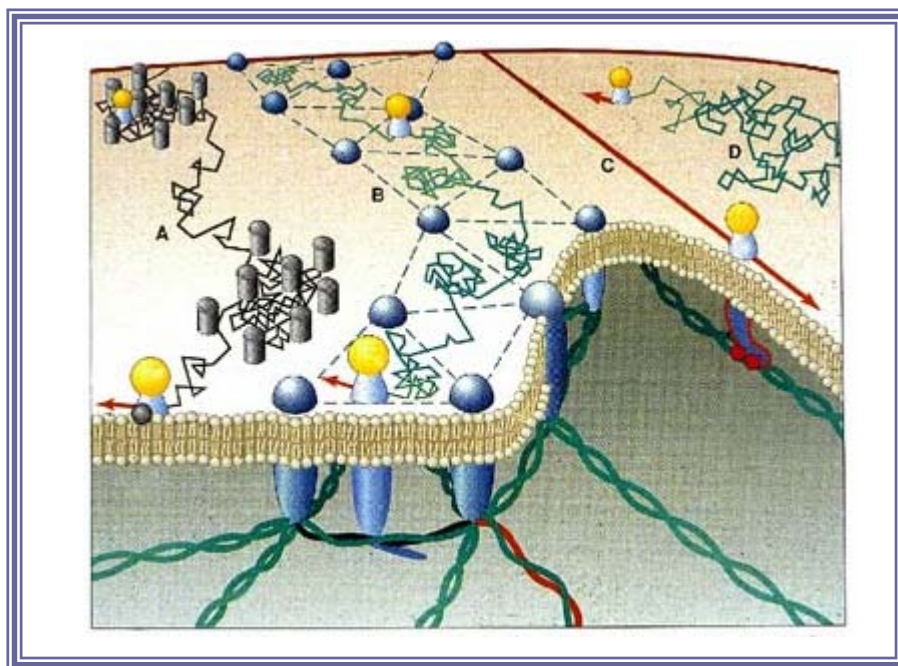


Figura 6. Modelos de difusión lateral en la membrana mediante SPT. Modelo A: confinamiento por obstáculos; Modelo B: confinamiento por el citoesqueleto; Modelo C: movimiento dirigido o mediado; Modelo D: difusión libre, movimiento aleatorio o al azar.

2.4. Ventajas del uso de SPT frente a FRAP.

SPT tiene varias ventajas sobre las medidas de recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueo (FRAP). La resolución espacial es aproximadamente dos órdenes de magnitud más alta que FRAP. La resolución temporal (Quian y cols., 1991) permite caracterizar el movimiento en dominios muy pequeños. SPT mide trayectorias individuales y por lo tanto, diversas subpoblaciones indistinguibles por FRAP, pueden ser resueltas por SPT, proporcionando la mejor especificidad en la medida del movimiento de los componentes de la membrana (Edidin M, 1994).

3. TRANSFECCIÓN GÉNICA

La transfección génica se ha convertido en una herramienta fundamental en la investigación moderna. Definida pues la transfección génica como el proceso por el que un gen o un fragmento de ADN foráneo es introducido en una célula, son varios los procedimientos por los que se puede conseguir la transferencia (Crystal y cols., 1995). En general, la eficiencia de la transfección dependerá de diversos factores, entre los que cabe destacar:

- La pureza del ADN objeto de la transfección.
- Las células "diana" utilizadas en la transfección.
- El mecanismo de introducción del ADN en las células diana.

Introducir ADN en células eucariotas es un procedimiento corriente en el laboratorio aunque hay diversos métodos con eficacia y toxicidad variables. Como regla general, cuanto mayor es la eficacia de la técnica para introducir el ADN en las células, mayor es la cantidad de células destruidas en el proceso. Este último punto es crítico puesto que debe mantener el ADN estructural y funcionalmente intacto y, además, debe conseguir que se transfiera al mayor número de células diana posible.

3.1. Métodos de transfección

Desde el inicio de la concepción de la utilización de genes como una nueva vía de terapia, uno de los primeros retos a considerar fue como lograr introducirlos en el interior de las células denominadas diana.

Hoy, la introducción del ADN exógeno, que podemos denominar "transgen", en la célula diana, se consigue a través de vectores.

Los vectores son sistemas cuyo objetivo es ayudar en el proceso de transferencia de un gen exógeno a la célula, facilitando la entrada y biodisponibilidad intracelular del mismo de modo que éste pueda funcionar correctamente. Pueden ser clasificados en vectores virales (Yang y cols., 1994a; 1994b; 1994c; Smith, 1995) y no virales (Alton y cols., 1993; Qing-Rong Chen y cols., 1999). Cuando se utilizan vectores virales para la transfección se suele hablar de transducción (Mitani y cols., 1994; Kruger y cols., 1999; Shinoura y cols., 2000). El tamaño de los fragmentos de ADN que se pueden transferir es, en la mayoría de los casos, muy limitado. A veces se puede utilizar un minigen construido artificialmente, que consiste en un ADNc con la secuencia codificante completa a la que se le añaden en los flancos las secuencias reguladoras adecuadas que aseguren una expresión elevada, por ejemplo, un potente promotor vírico. El método escogido para la transferencia génica depende de la naturaleza del tejido diana y de si la transferencia se realiza *ex vivo* (en células cultivadas) o *in vivo* (en células del paciente). No obstante, no existe un sistema de transferencia génica ideal, presentando cada uno sus ventajas e inconvenientes (Hodgson, 1993).

3.1.1. Métodos virales

La manipulación de virus es uno de los abordajes iniciales (Markowitz y cols., 1988; Miller, 1992; Anderson, 1992; Weissman, 1992; Mulligan, 1993; Morgan, 1993) en la introducción de genes en células eucarióticas. Dotados de alta capacidad de infectar, permiten la conservación estructural del ADN y la transfección de una gran cantidad de células (Salmons y cols., 1993; Brody y cols., 1994;

Crystal y cols., 1994; Zabner y cols., 1994). Los sistemas víricos de mamíferos han sido particularmente atractivos debido a su elevada eficiencia de transferencia (Dougherty y cols., 1989; Akali y cols., 1993; Englehardt y cols., 1994). Sin embargo, los problemas fundamentales que surgen con esta tecnología son la integración del ADN en el genoma de la célula huésped que puede producir una mutación no deseada (Samulski y cols., 1993; Tischlis y Lazo, 1991) o una recombinación con la consiguiente inactivación del gen introducido.

3.1.1.1. Retrovirus

Los retrovirus son virus cuyo genoma, de aproximadamente 9,7 Kb, está constituido por una cadena simple de ARN. Representan una buena opción para la introducción de genes en células animales puesto que su eficiencia puede, en algunos casos, llegar a superar el 90% de células infectadas (Eglitis y Anderson, 1988; Hatzoglou y cols., 1990; Scharfmann y cols., 1991; Ohashi y cols., 1992). A pesar de tener un genoma de ARN, una vez infectada la célula, éste se convierte en una copia de ADN debido al ciclo vital del virus (formación del provirus) que ahora puede insertarse en el genoma de la célula huésped.

Los vectores retrovirales utilizados en terapia génica humana han perdido su capacidad de replicación al eliminar del virus las secuencias gag, pol, y env que codifican nucleoproteínas responsables de la síntesis o recombinación de los ácidos nucleicos y componentes de la envoltura de la partícula viral (Mclachlin y cols., 1993). En contrapartida, al genoma viral se le incorpora una nueva secuencia génica que contiene el gen terapéutico. Para obtener grandes cantidades de este vector en estructuras capaces de infectar a las

células diana es necesario amplificarlo en unas células especiales denominadas "*empaquetadoras*" (Otto y cols., 1994). Éstas se caracterizan por poseer las secuencias gag, pol, y env que permiten el "*empaquetamiento*" del virus. Cuando el virus infecta la célula diana le introduce su material genético que gracias a la transcriptasa inversa pasará a convertirse en ADN proviral con capacidad de integrarse en el genoma de la célula infectada (Miller, 1992; Skotzko y cols., 1995).

Las principales ventajas de la utilización de retrovirus son:

La capacidad de producir altos títulos de virus e infectar numerosas células diana con el gen de interés.

La posibilidad de modificarlos por ingeniería genética para que sean mínimamente patógenos o no patógenos. Así, cuando infectan a una célula son incapaces de infectar a otra, lo que es en sí un factor de seguridad.

La capacidad de infectar prácticamente a todas las células que tienen su receptor.

Sin embargo los retrovirus también presentan desventajas, siendo las más importantes:

1. La limitación del tamaño de ADN que pueden empaquetar eficientemente (aproximadamente 9 Kb). Ésto hace que generalmente se utilice ADNC en vez de un gen con su estructura completa de exones e intrones.

2. La integración de su genoma en células que se están dividiendo (probablemente por ser incapaces de atravesar la membrana nuclear) y su tropismo hacia aquellas células que poseen el receptor adecuado.

3. La integración permanente que suele ser de aproximadamente $1/10^4$ células.

3.1.1.2. Adenovirus

Los adenovirus son virus cuyo genoma, de aproximadamente 36 Kb, está constituido por una doble cadena lineal de ADN. Los vectores adenovirales se construyen sustituyendo en su genoma secuencias responsables de la replicación (secuencias E1) por el gen que queremos transfectar. La replicación de este vector se lleva a cabo, de forma similar a los retrovirus, en células complementarias que poseen la secuencia E1 en su genoma. Este vector se internaliza en la célula diana por un mecanismo mediado por receptor y una vez en el endosoma se lisan, liberándose el ADN viral en el citoplasma celular (Horwitz, 1990; Stratford-Perricaudet y cols, 1990; Mittal y cols., 1993; Smith y cols, 1993; Shariat y cols., 2001).

Entre las ventajas de estos vectores debemos destacar que:

Pueden incorporar genes de hasta 36 Kb.

Su infectividad es muy alta, su título es elevado (hasta 10^{10} pfu/ml que a su vez pueden ser aumentados por métodos físicos hasta 100 veces), pudiendo infectar células en reposo o no replicantes. Son adecuados para infectar determinados tejidos in situ como el pulmón o el cerebro, lo que permite su administración local.

Entre las desventajas de estos vectores, que se están intentando resolver mediante el desarrollo de adenovirus mutantes, se encuentran:

1. No integran su ADN en la célula huésped.
2. Presentan un número muy grande de genes virales que pueden provocar su rechazo por el sistema inmune al cabo de un cierto tiempo o incluso transformar a la célula.
3. Su generación por técnicas de recombinación es compleja.

3.1.1.3. Virus asociados a adenovirus

Se trata de virus con ADN no patógenos de la familia de los parvovirus, que requieren la coinfección de otros virus para replicarse (Snyder y cols., 1997).

Estos vectores, de genoma pequeño, poseen una restringida capacidad de transporte de genes (menos de 4 Kb), aunque presentan un amplio rango de células donde pueden actuar sin necesidad de división celular. Su genoma está formado sólo por:

- a. Gen reproductor: codifica para una familia de proteínas relacionado con la replicación e integración del virus.
- b. Gen cap: codifica para una familia de tres proteínas estructurales.
- c. Extremos con terminales TR de aproximadamente 145 nucleótidos, acotando la porción de interés que va a transcribirse.

Los virus asociados a adenovirus proporcionan una expresión a largo plazo al ser introducidos en células que no se dividen. La integración en una célula en reposo es una clara ventaja cuando se trata de tejidos cuyas células no son activamente mitóticas (hepatocitos o neuronas). Aunque existe un sitio específico en el cromosoma 19 en el cual se integran sin afectar la función celular, esto parece ocurrir sólo cuando todos los genes del adenovirus están presentes. Si el material genético ha sido sustituido por genes heterólogos también se produce integración pero sin respetar el sitio específico de unión. A pesar de ello, este pequeño virus es un candidato alternativo al uso de retrovirus y tiene un gran potencial todavía por desarrollar. No obstante, un inconveniente destacable es la dificultad para obtener estos vectores en grandes cantidades.

3.1.1.4. *Herpesvirus*

Los herpesvirus, como el virus del herpes simple (VHS) y el de la varicela-zoster, son virus con ADN bicatenario lineal, con aproximadamente 100 a 250 kb (unas 50 kb en el VHS y 220 para el CMV). La estructura de su ADN es peculiar, existiendo dos trozos de ADN bicatenario lineal unidos, dando lugar a una estructura única a la que se ha denominado molécula L y molécula S. Los extremos de estas moléculas contienen de nuevo secuencias terminales repetitivas (TRL y TRS) siendo a este nivel donde se unen ambas moléculas.

Entre las cualidades de los herpesvirus hemos de destacar la capacidad de eliminar partes de su gran genoma para acomodar largos segmentos de ADN. Estos vectores son neuropáticos y por tanto pueden penetrar y entregar genes en el sistema nervioso manteniéndose en estado latente y por tiempo indefinido. Estas dos propiedades combinadas les han dado un lugar potencialmente singular como vector de transfección génica. Hasta ahora su único inconveniente es que los intentos por atenuar el virus han tenido un éxito limitado, teniendo capacidad límite para las células diana transfectadas (Glorioso y cols., 1995).

3.1.1.5. *Virus de la vacuna*

Los vectores basados en el virus de la vacuna consiguen que gran cantidad de células expresen eficazmente los genes transfectados por un corto periodo de tiempo. Lamentablemente, por el gran tamaño de su genoma, hace falta un proceso de recombinación complicado para insertar el gen escogido. Además, este virus es muy citopático. Tendrán que hacerse importantes modificaciones antes de que el virus de la vacuna se convierta en un vector génico con ventajas significativas sobre sus competidores.

Tabla 1. Características generales de los métodos virales de transfección

	Retrovirus	Adenovirus	Virus adeno- asociado	Herpes virus	Virus de la vacuna
Ácido nucleico	ARN	ADN	ADN	ADN	ADN
Tamaño del ácido nucleico	Pequeño	Pequeño	Muy pequeño	Grande	Muy grande
Tamaño genes transportados	4-8 kb	4-8 kb	< 4 kb	20 kb	25-75 kb
Integración en el genoma	Sí	No	Sí	No	No
Efecto citopático de los vectores	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Alto

3.2. Principales características de los sistemas no víricos utilizados como vectores en terapia génica

3.2.1. Métodos mecánicos y fisicoquímicos

La preocupación en torno a la seguridad de los virus recombinantes ha generado un interés creciente en el desarrollo de sistemas de vectores no víricos para la terapia génica. Los métodos mecánicos y fisicoquímicos son, en general, procedimientos de fácil aplicación aunque en ellos, la proporción de células transfectadas con el ADN exógeno es baja y el gen introducido puede alterarse al pasar por el citoplasma o bien al integrarse en el genoma celular de manera no específica (Mulligan, 1993).

3.2.1.1 Microinyección

La microinyección consiste en la introducción directa, mediante un micromanipulador, del material génico en el núcleo de una célula (Wolf y cols., 1990; Davis y cols., 1993). El método de inyección de ADN directamente es simple, económico y no tóxico comparado con la entrega mediante virus. El potencial para llevar largas construcciones de ADN es también ventajoso. No obstante, los niveles y persistencia de la expresión de genes es probablemente demasiado corta. Esta tecnología puede tener potencial como procedimiento de vacunación y de expresión de genes a un nivel bajo, lo que es suficiente para alcanzar una respuesta inmunológica. Es un método muy eficiente pero requiere la manipulación individual de cada célula.

3.2.1.2 Bombardeo de partículas

Este método se ha demostrado efectivo para transferir genes tanto *in vitro* como *in vivo*. El plásmido de ADN es revestido de gotas (de 1 a 3 micras de diámetro) de oro o tungsteno. Estas partículas son aceleradas por descarga eléctrica o por un pulso de gas y son "disparadas" hacia el tejido. La fuerza física del impacto supera la barrera de la membrana celular, lo que permite la transferencia génica con éxito en varios tipos de tejidos. Aunque estas técnicas de inyección estable son sencillas y relativamente seguras, la eficiencia de la transferencia génica es pobre, y se obtiene poca integración estable del ADN inyectado lo que limita su uso en los casos de células en proliferación activa. El problema es menor para tejidos que no proliferan regularmente, en los que el ADN inyectado puede continuar expresándose durante varios meses. Posiblemente puede ser aplicado como parte de un protocolo de vacunación, como demuestran las

investigaciones de Ulmer y cols. (1998) inyectando en músculo de ratón el gen que codifica la proteína de matriz del virus influenza A.

3.2.1.3. Electroporación

El proceso de electroporación consiste en aplicar corrientes eléctricas de alto voltaje a las células diana provocando poros nanométricos en su membrana. Ésto permite que el ADN de carga negativa perfore la célula en su camino hacia el ánodo y quede atrapado dentro de ella. Con esta metodología se han podido introducir fragmentos de ADN de hasta 150 Kb.

En esta metodología se debe tener en cuenta dos hechos; en primer lugar, la muerte celular que provoca el propio proceso de transfección y que puede situarse entre el 60 al 90% de las células diana; en segundo lugar, que la eficiencia de la técnica en condiciones óptimas se sitúa en torno a 25 a 30 células transformantes por cada 10^5 células vivas. Esta técnica se puede utilizar en todos los tipos celulares y su eficiencia está condicionada por la intensidad de la corriente eléctrica, el tiempo que separa una descarga de otra y la concentración y el tipo del ADN utilizado, obteniéndose con el ADN lineal mejores resultados que con el ADN superenrollado.

3.2.1.3. Rayos láser

Recientemente, el tratamiento de células en cultivo mediante rayo láser ha permitido provocar poros microscópicos que permiten el paso del ADN exógeno al citoplasma celular de forma similar a lo que ocurre en la electroporación. Su principal inconveniente es el sofisticado sistema que exige su aplicación.

3.2.1.4. Precipitación con fosfato cálcico

La capacidad de las células en cultivo para adquirir ADN foráneo mediante endocitosis aumenta consideradamente con la utilización del fosfato cálcico. Sin embargo, no se conocen las causas por las que este compuesto químico predispone las células a la transfección aunque si se conoce la reacción que provoca:



3.2.1.5. Liposomas

Los liposomas son partículas generadas *in vitro* cuya pared está formada por micelas lipídicas, lo que les permite fusionarse fácilmente con la membrana plasmática liberando su contenido dentro de la célula (Alton y cols., 1993; Lazo, 1996). Los liposomas, cargados positivamente, interactúan con las cargas negativas del ADN y lo compactan protegiéndolo de las enzimas (nucleasas) capaces de degradarlo. Así, lípidos monocatiónicos tales como DOTMA (N(1-(2,3-dioleoyloxy)-propyl)-NNN-trimethylammonium chloride) y péptidos policatiónicos de segunda generación como DOPSA (2, 3-dioleoyloxy-N-(2 (sperminecarboxamido) ethyl) -NN-dymethyl-1 propanaminium trifluoroacetate) forman liposomas que se unen espontáneamente a polianiones de ADN o ARN. El resultado es la captura del 100% de los complejos estables de polinucleótidos. Los lípidos pueden fusionarse a la membrana celular y entregar el ácido nucleico directamente dentro del citoplasma evitando la ruta de degradación lisosomal. El complejo ADN-liposoma puede ser utilizado como un método simple de transfección de células eucarióticas.

In vitro, la etapa de penetración en la célula no plantea problemas. Las moléculas comerciales son extremadamente eficaces sobre cultivos

celulares acercándose su eficiencia al 100%. In vivo, sin embargo, su eficacia es considerablemente menor. Así, después de la inyección por vía intravenosa de complejos cargados positivamente, se constata que la transferencia de genes tiene lugar principalmente hacia las células del pulmón y del hígado. Esta biodistribución sugiere que los complejos transfectantes se agregan en partículas de gran tamaño ya que, sin duda, interaccionan con proteínas de la sangre por lo que no pueden abandonar eficazmente el sistema vascular. Las partículas son retenidas mecánicamente por unos filtros naturales, los pulmones y el hígado, y penetran en las primeras células que encuentran en su camino.

En su eficiencia influyen distintos factores. Tanto la proporción de lípidos con respecto al ADN/ARN, como su concentración total tiene que ser cuidadosamente optimizadas para evitar la toxicidad observada con elevadas dosis. Este método es usado en general con una gran eficacia para transfectar ADN dentro de una amplia variedad de líneas celulares. Varios estudios han demostrado la eficiencia de liposomas policatiónicos en el reparto de ADN *in vivo* (Nabel y cols., 1992; Stewart y cols. 1992; Xu y cols., 1997; Qing-Rong Chen y cols., 1999).

Este método es una alternativa atractiva a los métodos de transferencia viral debido a que no hay obligaciones en el tamaño del ADN, presenta una baja inmunogenicidad y posee una fácil preparación. Sin embargo, su eficiencia de transfección es baja. Ésto se debe a que la mayor parte del material génico transportado es secuestrado y/o degradado en los endosomas, siendo pequeña la proporción de este material que alcanza el núcleo.

3.3. Transfección de neuronas

El Sistema Nervioso Central está compuesto por un entramado de células que de forma continua están transmitiendo información mediante sinapsis inhibitorias y excitadoras. El estudio de esta compleja interacción celular se ve dificultado por la cantidad de factores que intervienen. Un problema metodológico adicional, a la hora de abordar el estudio del SNC es la dificultad de transfectar células neuronales. Las células no replicativas como las neuronas no se transfectan adecuadamente con los métodos comunes de transfección, presentando una eficiencia de transfección muy baja para dichos métodos. Los problemas derivados de la dificultad para transfectar neuronas han provocado que se utilicen líneas celulares no neuronales, escogidas por ser fácilmente manipulables, de fácil mantenimiento en cultivo y por ser altamente transfectables, para estudiar procesos neuronales. Un ejemplo muy extendido es el uso de células de riñón humano, HEK293 o de riñón de mono, COS7 a las que se transfecta con ADN que codifica proteínas neuronales. Tras la sobreexpresión de estas proteínas neuronales se estudia su función, sus interacciones y su localización celular. Aunque los resultados utilizando células no neuronales son interesantes, es obvio que para comprender en detalle los complejos mecanismos que gobiernan la función de una neurona, es imprescindible realizar los estudios expresando las proteínas en su entorno natural, es decir, en las células neuronales en las que estas proteínas *in vivo* ejercen su función.

Es por lo tanto de vital importancia el desarrollo de técnicas de transfección eficaces a la hora de introducir ADN dentro de células nerviosas. El uso del adenovirus recombinante surgió bajo dicha

premisa y ha demostrado ser una herramienta fundamental para el estudio de los mecanismos celulares de las neuronas y de sus interacciones sinápticas, ya que es un método de transfección altamente eficaz para células que no se replican (LeGal La Salle et al, 1993). Se abre así una nueva etapa en el estudio de los procesos que intervienen en el mantenimiento del Sistema Nervioso Central. La transfección de neuronas *in situ* o en cultivos primarios, permite estudiar los procesos neuronales en células nerviosas *in vivo* e *in vitro*.

En el siguiente capítulo se presenta una descripción amplia de las características generales de los adenovirus, los pasos para la construcción de un adenovirus recombinante y su utilidad a la hora de transfectar neuronas y células no neuronales.

4. CONSTRUCCIÓN DE UN ADENOVIRUS RECOMBINANTE

El uso vectores de adenovirus para la transferencia de genes en células de mamíferos ha aumentando exponencialmente en los últimos tiempos. Debido a su gran potencial este innovador método de transfección celular esta siendo estudiado en profundidad y su aplicación en la transferencia de genes supone un exponente fundamental de la reciente línea de acción contra patologías genéticas como es "la terapia génica". Los vectores Adenovirus están siendo desarrollados para sobre-expresar proteínas en células humanas.

4.1. Descripción del Adenovirus

4.1.1. Características estructurales de los adenovirus y patogenicia

Los adenovirus son virus encapsulados con una doble hélice de ADN lineal (Figura 7). Todos los adenovirus tienen una simetría icosaédrica integrada por 252 capsomeros: 240 "hexones" y 12 "pentones". El corazón de la partícula contienen el ADN asociado covalentemente con proteínas terminales (se unen al extremo 5' del genoma) y proteínas básicas, similares a las histonas, que se asocian no-covalentemente al genoma. Esta asociación da lugar a una especie de estructura parecida a la cromatina. El genoma consiste en una doble hélice de ADN, no segmentada, de 36 kb (Bergelson y cols., 1997).

Los adenovirus son una causa frecuente de las infecciones agudas de las zonas respiratorias superiores, es decir, "resfriados". Algunos adenovirus son también capaces de transformar las células primarias de la rata y del ratón. La oncogenesis del adenovirus parece asociarse a infecciones abortivas y nunca se ha observado en seres humanos.

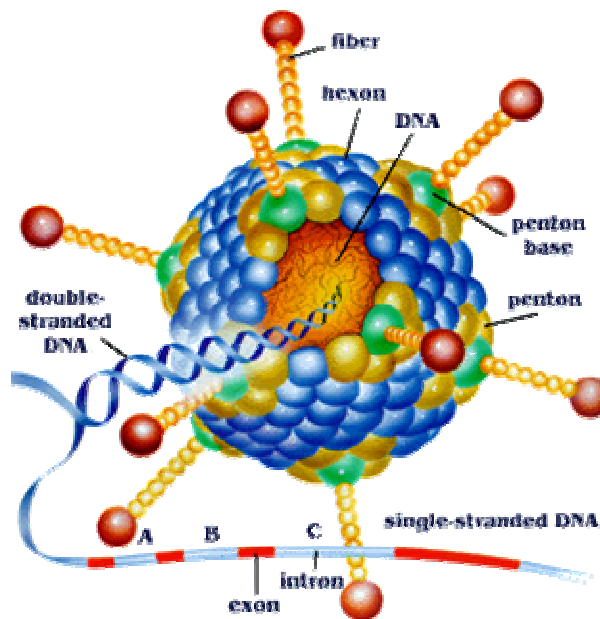


Figura 7. Representación de un adenovirus

4.1.2. Ciclo vital del Adenovirus

La reproducción de todos los adenovirus es similar y ocurre en el núcleo. El ciclo vital del adenovirus se divide en una fase temprana y una fase tardía. La última fase comienza con el inicio de la réplica del ADN. En la Tabla 2 se resumen el tiempo que dura cada una de las fases del ciclo infeccioso. El virus es incorporado dentro de la célula por mediación de dos proteínas receptoras: la proteína "car", un receptor que reconoce la fibra del adenovirus (Bergelson y cols., 1997) y proteínas integrinas de la cara celular, que sirven como receptores para los pentones del adenovirus (Wickhams y cols., 1993). La penetración implica fagocitosis en vacuolas fagocitarias, después de lo cual los pentones provocan la ruptura de la cápsula de fagocitosis y la liberación de la partícula viral dentro del citoplasma celular. El core

viral viaja hasta el núcleo y penetra por los poros celulares, allí se convierte en un complejo histona- ADN vírico.

La primera proteína ARN mensajera que se sintetiza (aproximadamente 1 hora después de la infección) es la proteína E1A. Esta proteína es un factor regulador de la transcripción, aunque su modo de acción se desconoce. No es un factor de transcripción del ADN, pero es una proteína necesaria para la activación de la transcripción de genes tempranos. E1A no demuestra ninguna especificidad de secuencia y es capaz de activar la transcripción de una amplia variedad de promotores virales y celulares. La segunda proteína que se sintetiza es la E1B. La unión de E1A y de E1B es capaz de transformar las células primarias *in vitro*. La proteína E1B se une a un supresor de tumor, p53, implicado en el control del ciclo celular.

La replicación del adenovirus comienza a las 5 horas tras la infección siendo un proceso unidireccional. La secuencia terminal de cada filamento contiene un origen de replicación. La iniciación de la replicación requiere la proteína terminal, dos factores eucariotas de transcripción y la polimerasa de ADN de la célula infectada.

En el inicio de la replicación, el patrón de transcripción cambia radicalmente desde los genes tempranos a los genes tardíos. Los genes tardíos se transcriben gracias al promotor tardío (MLP). El ensamblaje ocurre en el núcleo, pero comienza en el citoplasma cuando los monómeros individuales forman capsómeros hexómeros y pentómeros. La cápsula inmadura y vacía se ensambla en el núcleo a partir de sus precursores. El genoma se forma por la asociación del ADN y las proteínas del core.

Las células infectadas se mantienen intactas no produciéndose una lisis espontánea de las mismas. No obstante las células pierden su fenotipo normal y se redondean debido a la destrucción del citoesqueleto.

Tabla 2. *Etápas relevantes del ciclo infectivo adenoviral frente al tiempo*

HORAS	0	2	4	6	8	10	14	16	
Absorción, penetración, localización nuclear del genoma	→								
Transcripción temprana	→								
Replicación del ADN	→								
Transcripción tardía	→								
Ensamblaje viral	→								

4.1.3. Efecto del tipo salvaje de adenovirus en células humanas

La infección adenoviral tiene efectos drásticos en el metabolismo de las células infectadas. El virus usurpa la maquinaria sintética de su anfitrión para dirigir la producción de más de 5000 partículas virales (Green and Daesch 1961). Las células infectadas no se dividen, pero continúan aumentando en masa. Así, a las 32 horas después de la infección, su contenido proteico y de ADN es el doble que el de células no infectadas. El contenido de ARN de células infectadas aumenta del 30-80% durante los primeros momentos de infección para declinar posteriormente a niveles normales. Al mismo tiempo la síntesis de ARN de la célula anfitriona se suprime. La inhibición de la síntesis de ADN

celular comienza 6-8 horas después de la infección y termina virtualmente a las 10-13 horas (Pina and Green 1969).

La síntesis de proteínas de la célula anfitriona cesa siguiendo un patrón temporal paralelo (Grinsberg et al. 1977). Así, a partir de las 12 horas después de la infección, casi todos los aminoácidos marcados radiactivamente forman parte de polipéptidos virales. En estadios tardíos de la infección la mayoría de los ARN mensajeros son de origen viral (Lindberg et al. 1972). Sin embargo, la transcripción del cromosoma del anfitrión parece no verse afectada, ya que únicamente del 10 al 20% del ARN de nueva síntesis es viral (Price y Penman 1972; McGuire et al., 1976). No obstante la síntesis de formas maduras de ARN ribosomal disminuye seriamente por la infección adenoviral. Parece por tanto que un mecanismo virus-específico, hasta el momento desconocido, debe ser responsable de la traducción preferencial del ARN mensajero adenoviral. Un dato que soporta esta hipótesis es el hecho de que la coinfección de células humanas con el virus de la vacuna y el adenovirus no impidió la transcripción del virus de la vacuna pero suprimió la traducción de su ARN mensajero (Giorno y Kates 1971).

4.2. Potenciales aplicaciones de los adenovirus recombinantes

El uso de los adenovirus recombinantes tiene un enorme potencial tanto en investigación como para su uso como herramienta terapéutica. Desde su desarrollo a los comienzos de los años 80, los vectores adenovirales humanos se han utilizado con éxito para expresar una amplia variedad de genes virales y celulares en las células de mamíferos (Berkner, 1988; Gupta y cols, 2006).

Las proteínas producidas con el sistema de expresión del adenovirus se pueden utilizar para la caracterización bioquímica (Lamarche y cols., 1990, Paradis y cols., 1991 Stratford-Perricaudet y cols, 1990), para el desarrollo de posibles vacunas (Wu y cols., 2005; Wang y cols., 2006) y para desarrollar nuevos kits de diagnóstico. Su uso se puede, así mismo, extender al campo de la biotecnología ambiental, tal como, el estudio de la degradación enzimática provocada por la polución.

Los adenovirus recombinantes pueden "infectar" muchas y diversas líneas células o tejidos de origen humano y no humano. Las células que se pueden transfectar usando adenovirus pueden ser células con un alto grado de replicación o células que no se replican, como por ejemplo las neuronas.

El virus es incorporado por la célula pero no se replica. A este suceso se le denomina "infección abortada". Esta infección abortada puede por lo tanto ser utilizada como sistema de transfección para introducir genes en células y proceder al estudio de su expresión, Así mismo permite estudios de terapia génica *in vivo* e *in vitro*.

Este sistema de transfección ha sido también utilizado para producir animales transgénicos (Tsukui y cols., 1996).

4.3. Sobre expresión de proteínas recombinantes en células humanas

Por razones históricas, prácticas así como consideraciones económicas, los sistemas de expresión del E. coli han sido considerados como la principal opción a la hora de sobre expresar proteínas heterólogas (Scorer y cols., 1991). A pesar de la grandes

flexibilidad y eficacia de este vector de expresión, con unos niveles de expresión de proteínas celulares totales del orden de un 20-50%, el sistema *E. coli* presenta limitaciones para la expresión de diversas categorías de proteínas heterólogas. Esto es especialmente relevante para aquellos investigadores que estudien las complejas modificaciones a nivel pos-translacional observadas en la mayoría de las proteínas virales y de mamíferos. Estas limitaciones incluyen, inadecuada o total carencia de modificaciones a nivel post-translacional, plegamiento incorrecto, degradación proteolítica, ineficaz secreción, y pérdida de incorporación de algún aminoácido (Scorer y cols., 1991).

Debido a las limitaciones anteriormente descritas, se han dirigido los esfuerzos hacia el desarrollo de sistemas más sofisticados de expresión incluyendo otros procariotas, tales como levadura, y células eucariotas tales como células de mamífero y de insecto.

La tendencia actual en el campo de la expresión proteica es adaptar el desarrollo de los sistemas para cubrir las necesidades específicas de cada tipo de estudio. Inicialmente el uso de adenovirus surgió para paliar los defectos de los métodos anteriormente señalados, siendo considerado como un vehículo eficaz para aumentar los niveles de expresión de las proteínas recombinantes en células humanas.

El uso de adenovirus, parece pues, la mejor manera de obtener una gran expresión de proteínas humanas y una correcta expresión de aquellas proteínas que necesitan modificaciones post-transcripcionales. Así, este método permite la producción *in vitro* de proteínas idénticas a las proteínas nativas. Se expresan sin problemas proteínas estructurales, humanas o virales, al igual que enzimas implicadas en

una ruta metabólica de síntesis o de degradación. Por otra parte, a la hora de expresar proteínas reguladoras, como por ejemplo las proteínas que controlan el ciclo celular; proteínas de control de la apoptosis (Gupta y cols, 2006); factores de transcripción, etc la dificultad aumenta. Si la proteína que se quiere sobre expresar es levemente tóxica para la célula, la producción de la misma será más baja.

Aunque los niveles de expresión de muchas proteínas recombinantes producidos por la primera generación del sistema de adenovirus (Massie et al., 1986; Alkatib et al., 1988) fueron más bajos que los obtenidos con el sistema de expresión del vector Baculovirus (BEVS), el sistema de vectores de adenovirus humanos ofrece la ventaja de utilizar como huésped una célula humana (293A, línea celular derivada de un clón aislado de riñón de embrión humano). Al usar esta célula huésped humana las proteínas así producidas serán idénticas a sus homologas nativas (Massie y cols., 1995).

La expresión proteica con el sistema de expresión del adenovirus se incrementa enormemente al cultivarse las células 293A humanas en suspensión, con un nivel de 3-6 litros que rinden hasta 90 mg/l bajo condiciones óptimas (Garnier y cols., 1994). Para resumir, el uso del sistema de expresión AV/293 para la producción y la purificación de proteínas recombinantes representa un método muy eficaz y útil para la producción de altas concentraciones de proteínas.

4.4. El uso del adenovirus como método de transfección

El aislamiento y la caracterización de un gen específico es seguido con frecuencia por estudios de su función, localización, transporte e interacción molecular en células de mamíferos.

La necesidad de transfectar moléculas recombinantes de ADN en las células de mamíferos ha forzado el desarrollo de muchos diversos métodos de transfección, incluyendo la co-precipitación de calcio fosfato, la electroporación, y la transfección basada en lipoproteínas.

Aunque estos métodos son eficaces para la transfección de muchas líneas celulares comunes, existen otros muchos tipos de células que no pueden ser transfectadas rutinariamente ni eficientemente por estos métodos. Las limitaciones de estos métodos son incluso mayores cuando se pretende transfectar cultivos celulares primarios siendo, en la mayoría de los casos, extremadamente difíciles de transfectar por los métodos actuales. Esto constituye una gran desventaja, puesto que en muchos casos los estudios deben realizarse en cultivos primarios, que darán respuestas a funciones específicas de la célula que no han sido afectadas por un cultivo prolongado.

El uso de vectores de adenovirus tiene un gran potencial como método rutinario de transfección (Hendrie y Russell, 2005). El desarrollo de adenovirus recombinantes permite la infección de muchas y diversas líneas celulares así como de los tejidos de origen humano y no humano.

Una de las características que lo convierten en un método de transfección de gran relevancia es el hecho de que puede transfectar células replicantes o no-replicantes (Paul y cols, 2005). Esto permite que células como las neuronas que no se transfectan adecuadamente con otros métodos, o cuya eficiencia de transfección es muy baja, puedan ser transfectadas por medio de adenovirus. La transfección de neuronas in situ o en cultivo primarios, permite estudiar los procesos neuronales en células nerviosas.

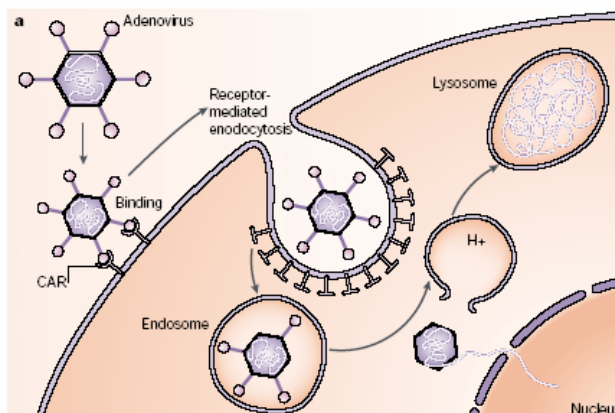


Figura 8. Representación del modo de acción de un adenovirus como agente de transfección.

Brevemente el mecanismo de acción del adenovirus es el siguiente (Figura 8). El virus es incorporado por la célula mediante endocitosis mediada por receptor quedando dentro de un endosoma. El adenovirus no tiene capacidad de replicación ya que se le ha “extirpado” el gen esencial temprano E1, que es imprescindible para la autoreplicación viral, pero su ADN es incorporado por la célula huésped. Se trata por tanto de una infección abortada que constituye un sistema de transfección eficaz para introducir un gen funcional en las células.

4.5. Producción de animales transgénicos

La tecnología del uso de animales transgénicos para el estudio de enfermedades humanas está desarrollándose rápidamente en los últimos tiempos. Aplicándose, así mismo, a la producción de biomaterial en animales (órganos humanos en cerdo, proteínas específicas en leche, ect.)

Tsukui et al. (1996) han demostrado que el adenovirus se puede utilizar para generar eficientemente animales transgénicos.

4.6. Ventajas del uso de Adenovirus Recombinantes como método de transfección

a) Se pueden clonar en el vector del adenovirus grandes cantidades de ADN. El Adenovirus recombinante puede incorporar hasta 7,0 kb de ADN. Las regiones tempranas E1 y E3 del adenovirus, se han suprimido para proporcionar más sitio de clonación.

b) Pueden producirse grandes cantidades de expresión (altos títulos) con una gran eficiencia de replicación. Permite títulos de 10^8 a 10^9 partículas virales/ml y puede ser concentrado hasta 10^{11} partículas virales /ml. De acuerdo con estos criterios, es el mejor sistema vector para aplicaciones en terapia génica.

c) Posee una amplia gama de células "anfitrión" y presenta una baja patogenicidad en humanos. El sistema de expresión de adenovirus se ha utilizado extensamente para expresar tanto proteínas humanas como no humanas. Los adenovirus pueden infectar una amplia gama de células mamíferas, y por lo tanto, esto permite la expresión de proteínas recombinantes en la mayoría de las líneas celulares y de los tejidos de mamíferos (van der Wouden y cols, 2004).

d) Sistema homólogo para los genes humanos. El sistema de la expresión del adenovirus utiliza un virus humano como vector y células humanas como células huéspedes (Garnier et al., 1994). Por lo tanto, proporciona el ambiente ideal para el plegamiento apropiado y las modificaciones postranscripcionales exactas de las proteínas humanas. Permite expresar la mayoría de las proteínas humanas

e) Infecta y expresa genes en células replicativas y no-replicativas (LeGal y cols., 1993). Los retrovirus, al contrario infectan únicamente células replicativas. El adenovirus puede infectar todas las clases de células, excepto algunas células linfoides. El adenovirus es el mejor sistema para estudiar la expresión de genes en células no-replicativas primarias. Esto permite una comparación directa de los resultados obtenidos con las líneas celulares transformadas y las células primarias.

f) No provoca mutagénesis. Se mantiene fuera del cromosoma.

Los Retrovirus se integran aleatoriamente en el cromosoma del anfitrión y pueden desactivar genes o activar oncogenes. Para la terapia génica, los adenovirus siguen siendo epicromosomales en todas las células probadas, excepto en los cigotos, y por lo tanto no, interfieren con otros genes del anfitrión. La integración de solamente una copia del virus en las zonas libres de los cigotos, es el mejor sistema para producir animales transgenicos con características específicas (Hendrie y Russell, 2005)

g) Propagación en cultivos en suspensión. Las células humanas 293 (Garnier el al., 1994), se pueden adaptar para crecer en suspensión. Esta adaptación permite aumentar la escala del sistema.

d) Expresión simultánea de múltiples genes. Éste es el primer sistema de expresión que se puede diseñar fácilmente para expresar múltiples genes en la misma línea celular o tejido. La manera más simple es construir diversos virus recombinantes cada uno que exprese una proteína distinta, y realizar una co-infección de la célula deseada. Esto proporcionará la apropiada co-expresión de las proteínas recombinantes (Green and Daech 1961).

e) Alto nivel de la expresión de proteínas funcionales (Lamarche y cols., 1990; Scorer y cols, 1991). Las proteínas recombinantes pueden

representar hasta el 10 a 20 % de las proteínas celulares totales (TCP). Esto está cerca de los límites del sistema para obtener proteínas correctamente ensambladas y transcripcionalmente modificadas.

4.7. Construcción de Adenovirus Recombinantes

La construcción de adenovirus recombinantes es un proceso que se realiza en dos etapas (He y cols., 1998; Flotte y cols., 1995), en las cuales el "casete" de expresión deseado, se introduce primero en un vector de transferencia, y posteriormente es transferido al genoma adenoviral mediante recombinación homóloga (Figura 9). La inserción de ADN por recombinación homóloga es la manera más eficiente de introducir un gene en los vectores del adenovirus por dos razones: 1) La molécula de ADN adenoviral es lineal y contiene sitios de corte para casi todas las enzimas de restricción y; 2) el genoma es lo suficientemente grande (36 kb) para ser manipulado fácilmente.

El genoma del adenovirus salvaje es modificado substancialmente para producir un vector recombinante. Se suprimen regiones del genoma viral. Esto se hace primero para prevenir la infección lítica y segundo para hacer espacio para introducir el ADN exógeno que interesa transfectar. Con esto, queda espacio suficiente para encapsular dentro del adenovirus hasta 38 kb.

La supresión de la región E3 del genoma viral, para dejar espacio donde insertar los genes heterólogos, se logra por medio de recombinación homóloga. La introducción de la construcción heteróloga del ADN exógeno en el ADN viral, resulta en la delección automática de la región E1. La pérdida de la región E1 genera un

vector deficiente que no es capaz de replicarse. La delección combinada de las regiones E1 y E3, por otra parte proporciona una capacidad libre de 7 kb.

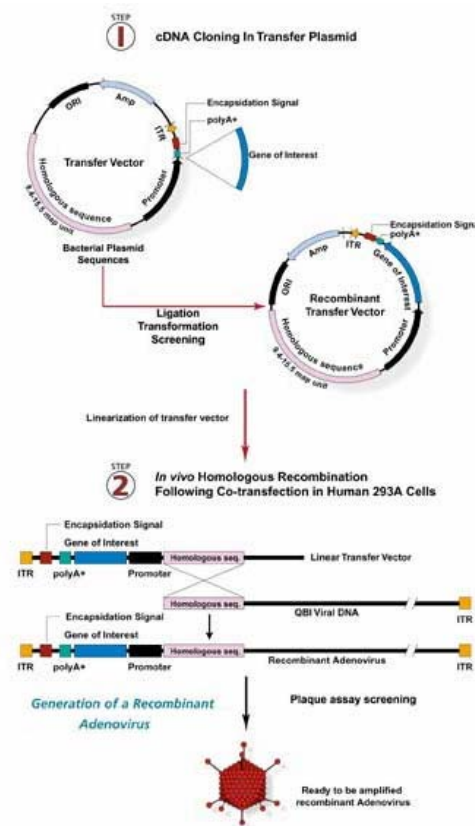


Figura 9. *Etapas de la construcción de un adenovirus recombinante*

Los vectores de transferencia, contienen dos regiones de ADN del adenovirus: el origen de replicación, o ITR (repetición terminal invertida) y una región de ADN viral lo bastante larga para generar recombinantes homólogos a alta frecuencia (Massie y cols., 1998b). Este fragmento de 2.5 Kb corresponde a las unidades 9,4 a 15,5 del mapa del genoma del adenovirus. Los vectores también contienen los

sitios únicos de restricción (5' del ITR), que se utilizan para linealizar el vector antes de la cotransfección con el vector adenoviral lineal.

El ADN exógeno presente en el vector adenoviral debe encontrarse en la forma de un "casete" de expresión autónomo. (Horwitz, 1990) Este casete debe contener:

- a) Un promotor (+/- los reforzadores apropiados)
- b) Las secuencias de codificación (ADN o secuencias genómicas)
- c) Los sitios de empalme (en caso de necesidad)
- d) Una secuencia señal de poliadenilación.
- e) Opcionalmente, puede también contener un marcador para facilitar la purificación de las proteínas que se sobre expresan.

El sistema de expresión del adenovirus se utiliza sobre todo para expresar proteínas mamíferas. Una vez que el casete de expresión se haya introducido en el vector de la transferencia, el último se linealizará cerca del ITR para asegurar la réplica eficiente del virus recombinante (Clark y cols., 1999). El casete de expresión no debe contener sitios de restricción que correspondan a la enzima usada para linealizar el vector (Chang and Shenk, 1990).

El vector linealizado que contienen el DNA a transfectar, es co-transfectado en las células humanas 293 junto al brazo largo del vector adenoviral. La recombinación en las células 293 entre las regiones homólogas del vector linealizado y el genoma del adenovirus, da lugar a la formación del adenovirus recombinante completo (Garnier et al., 1994; Inoue and Russell, 1998).

Como anteriormente se ha mencionado, la recombinación citada dará lugar a la pérdida de la región E1. Por lo tanto, estos adenovirus

necesitan que se les suministre la región E1 para poder replicarse. Esto se consigue mediante la línea celular 293, a la que se ha transfectado de modo estable con la región E1 del adenovirus entera. Las células 293 integran dicha región en su cromosoma y proporcionan así las proteínas adenovirales necesarias para la replicación (Inoue and Russell, 1998).

Los virus recombinantes resultantes pueden ya multiplicarse y formar colonias sobre la monocapa de células 293. Estas colonias del adenovirus recombinante son posteriormente extraídas y purificadas (Massie y cols., 1996).

5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO REALIZADO

Los receptores GABA (ácido gamma-amino butírico) intervienen en el control de las funciones neuronales normales del organismo. En el Sistema Nervioso Central (SNC), la neurotransmisión inhibitoria rápida es mediada por los receptores de GABA. Todas las neuronas en el SNC parecen responder a GABA, y aproximadamente el 20% de las sinapsis en el SNC utilizan este neurotransmisor (Deisseroth y Malenka, 2005). Su preciso funcionamiento permite mantener el delicado equilibrio entre las sinapsis excitadoras e inhibitoras. Desde un punto de vista clínico, la importancia de estudiar dichos receptores viene determinada por el hecho de que una amplia gama de fármacos psicotrópicos modulan su función (Pritchett et al., 1989a; Wafford y cols., 1993; Sigel et al., 1990; Hadingham y cols., 1993; Thompson y cols., 1996b; Wulff and Wisden, 2005).

El estudio de los receptores GABA es, por lo tanto, el objetivo principal de un amplísimo número de grupos de investigación, centrados en el campo de la neurociencia y la neuromedicina, a nivel mundial. La gran heterogeneidad genética de estos receptores (McKernan y Whiting, 1996; Whiting y cols., 1997) condiciona no sólo sus diferentes propiedades, sino también sus distintas afinidades farmacológicas. Conocer el comportamiento de los receptores de neurotransmisores, determinado por su carga genética, podría condicionar futuros tratamientos con fármacos. Si se establece qué combinación de genes, dará lugar a un receptor que sea más sensible a ciertos fármacos, o que se localice y ancle en puntos funcionales de las neuronas, se podrían tratar ciertas enfermedades neurológicas como el Parkinson, el Alzheimer y la Epilepsia entre otras.

II. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis fue determinar si subunidades concretas de los receptores GABA ejercen una función de control sobre la dinámica de membrana del complejo, y cuales son los dominios de dichas subunidades implicados.

Los objetivos particulares de este trabajo de investigación fueron:

1. Valorar la eficiencia de los métodos de transfección no víricos, comúnmente usados en los laboratorios de investigación, en dos líneas celulares no neuronales, HEK293 y COS7, una línea celular PC12 modelo de célula neuronal, y en neuronas del cerebelo.

2. Construcción de un adenovirus recombinante para utilizar como sistema de transfección en neuronas. Se realizó la construcción de dos adenovirus a los que se introdujo el gen que codifica para las subunidades quiméricas del receptor GABA alfa1CH y alfa1CD:

a) Subunidad alfa1 bovino/rata quimera (alfa1CH) o subunidad manipulada de alfa1 compuesta por la región 5' terminal del ADN de la subunidad alfa1 bovina y la región 3' terminal del ADN de la subunidad alfa1 de rata.

b) Subunidad alfa1 bovino/rata con el lazo citoplasmático escindido (alfa1CD), donde la subunidad alfa1 bovino/rata quimera (alfa1CH) se trató con enzimas de restricción para escindir la región citoplasmática M3/M4.

3. Transfección de líneas celulares no neuronales y neuronas con el adenovirus recombinante

4. Estudio de la dinámica de membrana de los receptores GABA por medio de la técnica de "Seguimiento Individual de Partículas Marcadas" en células no neuronales (COS7) y en neuronas granulares de cerebelo de rata.

Capítulo III
MATERIAL Y MÉTODOS

1. METODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

1.1. Construcción de las subunidades quiméricas

Las subunidades del receptor GABA, fueron amablemente donadas por el Dr. Seeburg, clonadas dentro del vector de expresión en mamíferos pCDM8. Dicho vector está bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV) y de una secuencia SV/Poly A.

El ADN de las subunidades alfa1 procedía de bovino, mientras que el ADN de la subunidad beta3 procedía de rata.

Para la construcción de las subunidades quiméricas de alfa1 se tomó la subunidad alfa1 de bovino y se procedió a realizarle las siguientes modificaciones.

1.1.1. Construcción de la subunidad quimérica alfa1-CH

Subunidad quimérica de alfa1 compuesta por la ligación entre un fragmento del ADN de la subunidad alfa1 procedente de bovino y un fragmento del ADN de la subunidad alfa1 procedente de rata. Para lo cual se ligó la región 5' terminal del ADN de alfa1 de bovino y la región 3' terminal del ADN de rata.

Esta subunidad quimérica fue ingenierada por dos razones fundamentales. Primero, el anticuerpo monoclonal, bd24, reconoce y es específico para tres aminoácidos situados en la terminación-N de la secuencia de las subunidades alfa1 de bovino y de humano, que no se conservan fielmente en la secuencia de la alfa1 de rata. Por lo tanto bd24 no reconoce la subunidad alfa1 de rata (Ewert y

cols., 1990). La secuencia de aminoácidos restantes entre las subunidades alfa1 de bovino/humano y de rata es idéntica.

De este modo, el ADN de la subunidad quimérica alfa1CH al ser traducido da lugar a una subunidad alfa1 con una secuencia de aminoácidos idéntica a la de la subunidad alfa1 salvaje de la rata, con la única excepción de un solo aminoácido en la terminación-N, que es un componente esencial del epítopo para el anticuerpo monoclonal bd24.

En segundo lugar, la secuencia de nucleótidos del ADN de la alfa1 de rata tenía sitios de la restricción que permitieron la construcción de la otra subunidad truncadas.

Procedimiento:

1. Se cortó el ADN de la subunidad alfa 1 de bovino con las las enzimas de restricción Bsp120I – EcoNI
2. Se cortó el ADN de la subunidad alfa1 de rata con las las enzimas de restricción EcoNI- EcoRI
3. Se realizó una reacción de ligación entre los dos fragmentos obtenidos anteriormente.
4. La ligación se introdujo en el vector de expresión de mamíferos pCDNAIamp

1.1.2. Construcción de la subunidad quimérica alfa1-CD

La subunidad quimera alfa1-CD, consistió en una subunidad alfa1 donde se le escindió el dominio intracitoplasmático M3/M4.

Para lo cual se partió de la subunidad quimérica a1CH y esta se trató con encimas de restricción para cortar el lazo intracitoplasmático M3/M4. Por lo que a1CD constituye una subunidad de alfa1 sin el

dominio M3/M4 y con el epitope para ser reconocida por el anticuerpo bd24.

Porcedimiento:

1. Se introdujo sitios de corte para las encimas BamHI (negrita) y XhoI (subrrayado) en el ADN de la subunidad α 1CH mediante amplificación por reacción de PCR utilizando los siguientes primers:

- Reverso: el universal sp6
- Directo: 5' **aggatcctctctcgagcgtcagcaaaatcgaccg** 3'

2. Se digirió la subunidad quimérica α 1CH mediante las encimas BamHI y EcoRI.

1.2. Generación de bacterias competentes

Se cultivó una alícuota de 100 μ l del stock de bacterias congeladas en 20 ml de medio LB, dejándolas crecer a 37°C con agitación continua hasta que alcanzó la saturación. El cultivo se diluyó 1/200 en 100 ml de medio LB y se cultivó en agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 600 nm. Se pasó a hielo, se agitó durante 3 min, se dividió en dos tubos de 50 ml y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min a 4°C. Cada pellet bacteriano se resuspendió en 12.5 ml de Cl_2Mg 0.1 M, pasando posteriormente los dos a un único tubo que se agitó a 4°C durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se centrifugó en las mismas condiciones anteriores y el pellet se resuspendió en 25 ml de Cl_2Ca 0.1 M, pasándolo a hielo y manteniéndolo 20 min con agitación. Finalmente las bacterias se centrifugaron obteniendo un pellet que se

resuspendió en 5 ml de una solución Cl_2Ca 0.1 M y glicerol al 20%. Se alicuotaron y se congelaron rápidamente a -80°C .

Medio LB: 10 gr bactotryptona (Sigma, S.L.), 5 gr de bacto yeast (Sigma, S.L.) y 10 gr de ClNa en 950 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7.4 con NaOH (5 N). Llevar hasta un litro. Autoclavar durante 20 min.

1.3. Confección de placas de agar/ampicilina

El medio LB se suplementó con agar (Oxoid L 11) al 11.5% y se autoclavó. Se dejó enfriar hasta aproximadamente 50°C y se le añadió ampicilina hasta una concentración de $100\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$. El medio se vertió en placas Petri colocadas en campana de flujo laminar (aproximadamente 20 ml / placa) dejándolas hasta solidificación. Se guardaron envueltas en papel de aluminio a 4°C .

1.4. Transformación bacteriana

Para realizar la transformación se descongeló, lentamente y en hielo, un tubo con 100 μl de bacterias competentes (la descongelación en hielo es importante puesto que sin ella las bacterias pierden su eficiencia). Se mezclaron 5-10 μl de la reacción de ligación con las bacterias competentes y se incubaron en hielo durante 30 min. Después, se sometieron a un choque térmico (42°C durante 30 seg) y se volvieron a introducir en hielo durante 1 a 2 min. Tras este paso, se recuperaron las bacterias añadiendo 900 μl de medio LB al eppendorf e incubando a 37°C durante 1-1.30 h en agitación. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 3000 rpm en microcentrífuga y el pellet se

resuspendió en 100 µl de LB. De este último, se cultivó de 25 a 50 µl en placas y se incubaron en estufa a 37°C durante aproximadamente 12 h.

1.5. Cultivo bacteriano a gran escala

Las colonias de la placa se picaron y se crecieron en 10 ml de medio LB a 37°C con agitación continua hasta saturación. Al medio se le añadió previamente 10 µl de ampicilina (100 µg/ml), antibiótico al que era resistente la bacteria. Una vez alcanzada la densidad óptica adecuada, los 10 ml del cultivo se pasaron a 800 ml de medio LB/ampicilina. El cultivo se mantuvo durante 24 h a 37°C con agitación continua.

1.6. Extracción y purificación del plasmido

La extracción del plásmido se realizó mediante el Kit "QIAprep Spin Miniprep" (QIAGEN, Germany) mediante el siguiente protocolo: de 1 a 5 ml del cultivo de bacterias fue centrifugado a 4000 rpm durante 15 min a 4°C. El pellet bacteriano se resuspendió en 250 µl del buffer de resuspensión P1 al cual se le añadió RNAsa y se transfirió a tubos de microcentrífuga. Fue lisado añadiendo 250 µl de solución de lisis (buffer P2) y mezclando suavemente por inversión durante 5 min. Las estructuras citoplasmáticas y de membrana así como el ADN cromosómico y el ARN de alto peso molecular fueron precipitados y neutralizados (aspecto de clara de huevo) añadiendo 350 µl del buffer N3 con el que se mezcló suavemente varias veces a temperatura ambiente. Después de centrifugar durante 10 min, el sobrenadante fue transferido a las columnas de QIAprep. Se centrifugó durante 30 a 60

seg. Se le añadieron 0.75 ml de buffer PB y se volvió a centrifugar durante 30 a 60 min. El precipitado fue retirado y la columna se centrifugó otro minuto para eliminar el resto del buffer de lavado. La columna se depositó en otro tubo y se le añadió 50 µl del buffer EB, se dejó reposar un minuto y se recuperó por centrifugación a 4000 rpm durante un minuto.

Buffer P2: NaOH 0.2 M y SDS al 1%.

Buffer EB: 10 mM Tris-Cl, pH 8.5.

1.7. Análisis de los plásmidos recombinantes

Varias colonias bacterianas fueron seleccionadas y chequeadas para confirmar la presencia de plásmido recombinante. El estudio se realizó mediante digestión enzimática y PCR.

1.8. Análisis mediante digestión

Los plásmidos fueron digeridos siguiendo el protocolo visto anteriormente, y fueron sometidos a electroforesis para analizar los fragmentos resultantes. Las enzimas utilizadas fueron:

* BglII (Roche Diagnostics, Se)

* PmeI (Roche Diagnostics, Se)

1.9. Análisis mediante PCR

El estudio mediante PCR de la presencia del inserto se realizó utilizando los primers:

- Reverso: el universal sp6
- Directo: 5' **aggatcctctctcgagcgtcagcaaatcgaccg** 3'

El análisis del amplificado se realizó mediante electroforesis.

Se chequearon 5 µl de plásmido digerido y del producto de la PCR realizando electroforesis a 80 V durante 2 h en un gel de agarosa al 2%.

1.10. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

1.10.1. Preparación del gel de agarosa

Se disolvieron 2.4 gr de agarosa calentándola hasta ebullición en 294 ml de agua y 6 ml de 50 x TAE (concentración final de agarosa 0.8%). Se dejó enfriar hasta una temperatura de 60°C y se le añadió 30 µl de bromuro de etidio. Se mezcló suavemente para evitar la formación de burbujas y se depositó sobre un portageles con peine donde se dejó solidificar. Por último, se colocó el gel de agarosa en el interior del aparato de electroforesis que contenía ya la cantidad suficiente de buffer de electroforesis (1 x TAE) para cubrir el gel.

Tampón concentrado de electroforesis (50 x TAE): Tris-acetato 2 M y EDTA 0.05 M, pH 8. Para su utilización en la electroforesis se diluye 50 veces.

1.10.2. Electroforesis

A las diferentes muestras de ADN se les añadió un volumen 1/10 de tampón de carga LB y se cargaron en los pocillos del gel. Los fragmentos obtenidos de la digestión de las muestras fueron

separados mediante electroforesis, en el gel de agarosa (0.8%) a bajo voltage (40 V) durante toda la noche.

1.11. Obtención de ADN tras electroforesis en un gel de agarosa

El plásmido digerido se sometió a electroforesis en un gel de agarosa (0.8%), posteriormente, las bandas obtenidas fueron purificadas utilizando el Kit Gene-Clean (QIAGEN, Germany). Se cortó con un bisturí la banda que corresponde al ADN lineal visualizado con el transiluminador de ultravioletas. El trozo de gel se depositó en un eppendorf que se calentó a 55°C durante 10 min, tiempo suficiente para fundir la agarosa. Se le añadieron 5 µl de la solución de silicagel, se agitó bien, se incubó durante 5-15 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 15000 rpm durante 30 seg, desechando el sobrenadante. El pellet de silicagel con el ADN plasmídico, se lavó tres veces con 500 µl de solución de lavado, se secó ligeramente y se resuspendió en un volumen entre 10-20 µl de agua bidestilada. Se incubó durante 5 min a 55°C y se centrifugó durante 3 min retirando el sobrenadante (donde se encuentra el ADN) cuidadosamente para evitar el arrastre de silicagel, el cual puede interferir en posteriores ensayos. El vector digerido y purificado se guardó a -20°C.

2. CONSTRUCCIÓN DEL ADENOVIRUS RECOMBINANTE

2.1. Introducción de sitios de corte para las enzimas BglII y PmeI en el ADN de las quimeras

Se introdujeron sitios de corte para las enzimas BglII y PmeI en el ADN de las subunidades quimeras. Así, nos aseguramos de la correcta orientación del inserto en el vector adenoviral. Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los siguientes primers:

5´ - GCAAGAAGATCTATGAAGAAAAGTCCGGGT- 3´

5´ - AGCTTTGTTTAAACTTAAGACAGAGGCAGTAAGGC- 3´

La PCR se realizó mezclando los siguientes productos en el orden indicado:

- 30 µl de H₂O
- 10 µl del tampón de PCR (10x)
- 4 µl de MgCl₂
- 16 µl de dNTP (Promega, Madison, WI)
- 1 µl de Primer 1
- 1 µl de Primer 2
- 1 µl de ADN inserto
- 67 µl de H₂O

A esto se le añadió la enzima, 0.5 µl de la Taq polimerasa (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), tras el ciclo de desnaturalización y elongación.

Los 32 ciclos de amplificación vienen detallados en la tabla 3.

Tabla 3. Características de la reacción de PCR

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
94	5	1
72	1.30	30
94	0.75	
55	0.75	
72	1.30	
72	5	1

2.2. Purificación de los productos obtenidos de la PCR.

Los productos amplificados obtenidos por PCR fueron purificados utilizando el Kit QIAquick (QIAGEN, Germany) mediante el siguiente protocolo: al producto de la PCR se le añadieron 450 μ l de la solución PB. La mezcla se pasó por la columna de QIAquick y se centrifugó durante 30-60 seg a 14000 rpm. La columna se lavó con 0.75 ml de la solución PE y se centrifugó, 30-60 seg a 14000 rpm. Tras retirar la solución filtrada, se volvió a centrifugar un minuto para eliminar los posibles restos de etanol. Después, se pasaron las columnas a ependorf, se les añadió agua bidestilada o buffer EB y se centrifugaron

un minuto a 14000 rpm obteniendo una solución que contenía los fragmentos amplificados.

2.3. Digestión de los productos de PCR

Los productos obtenidos de la reacción de PCR fueron verificados mediante digestión con las endonucleasas de restricción que se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 4

	Sin cortar	BamHI	EcoRI	XhoI	DraI	NdeI
H ₂ O	8	6.5	7.5	6.5	7.5	7.5
10x buffer	1	1	1	1	1	1
10x BSA	0	1	0	1	0	0
ADN	1	1	1	1	1	1
Enzima	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Volumen T	10	10	10	10	10	10

2.4. Obtención del vector

El vector utilizado fue el plásmido recombinante pQBI-AdCMV5-BFP (Quantum, Canada). El mapa de restricción completo se muestra en el Anexo I).

pQBI-AdCMV5-BFP contiene el promotor, CMV5, seguido de una secuencia para multiclonaaje (ver Resultados).

2.5. Digestión del vector pQBI-AdCMV5-BFP con las enzimas de restricción BglII y PMeI.

Primero se determinó si la enzima de restricción BglII ejercía su acción en el bufer nº4. Se procedió de la siguiente forma: en un tubo eppendorf se mezclaron: 7µl de agua; 4µl de 10x tampon nº4 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN); 1µl (1 µg) 10x BSA; 0,5 µl (250 ng) del vector; 5 U de la enzima BglII (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Se incubó a 37°C durante 1.30 horas. El resultado de la digestión se verificó en gel de agarosa 0,8%

El plásmido fue digerido entonces con las enzimas de restricción BglII y PMeI (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), a 37°C, durante 4 h. Así pues, en un tubo eppendorf se mezclaron: 37,5 µl de agua; 5 µl de 10x tampon nº4 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN); 0,5 µl (0,5 µg) 10x BSA; 2 µl (1000 ng) del vector; 5 U de cada una de las enzimas BglII y PMeI (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN).

El plásmido digerido se sometió a electroforesis en un gel de agarosa (0.8%).

2.6. Digestión de las quimeras de alfa1 con las enzimas de restricción BglII y PMeI.

Las quimeras de alfa1 fueron digeridas con las enzimas de restricción BglII y PMeI (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), a 37°C, durante 4 h. En un tubo eppendorf se mezclaron: 37,5 µl de agua; 5 µl de 10x tampon nº4 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN); 0,5 µl (0,5 µg) 10x BSA; 2 µl (1000 ng) de la quimera; 5 U de

cada una de las enzimas BglII y PMeI (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN).

2.7. Clonación del ADN en el vector de transferencia del adenovirus

El vector y el inserto se sometieron a una reacción de ligación de extremos cohesivos. El corte con las mismas enzimas de restricción, permitió la orientación adecuada de los insertos. Para la construcción del vector recombinante del adenovirus se utilizó la razón de 2 moléculas de ADN por cada molécula de vector de transferencia.

El vector de transferencia usado fue el pQBI-AdCMV5-BFP (mapa de restricción completo en Anexo I).

Para una reacción de ligación que contenía 100 ng del vector se utilizó la siguiente regla para calcular el ADN a añadir:

$$\text{Cantidad de ADN en ng} = \text{longitud del ADN en bp} \times 0.025$$

Se determinó añadir:

Para el alfaCH= 37 ng

Para el alfaCD= 32 ng

Reacción de ligación:

100 ng del vector (5 μ l)

37 ng de alfaCH ADN (3 μ l) ó 32 ng de alfaCD ADN (3 μ l)

Tampon de ligación con 1 nM de ATP 10X (1 μ l)

Ligasa de ADN T4 (1 μ l).

Incubar 24 horas a 4 °C.

Controles:

Control 1 (C1): No inserto: No se añadió ADN de las quimeras

Control 2 (C2): No vector: No se añadió vector

El producto de la ligación se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa.

2.8. Transformación de bacterias *Escherichia Coli* competentes con la ligación adenovirus vector+ ADN quimeras

Con los productos de ligación se transformaron bacterias *Escherichia Coli* competentes. Se purificaron varias colonias virales, se multiplicaron y, posteriormente, se procedió a la extracción del plásmido mediante minipreps.

2.9. Verificación de los producto de ligación vector + quimera alfa1.

El resultado de la ligación y la correcta orientación del ADN inserto se verificó mediante:

1. Electroforesis en gel de agarosa
2. Reacción de PCR
3. Mediante digestión con las endonucleasas EcoRI; EcoNI; BglII+PmeI; EcoNI; AatII; Bst EII; Hae III; XhoI; xbaI; BglII+PmeI (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)

2.10. Cultivo de las células empaquetadoras QBI-293A

Las células 293 se cultivaron siguiendo procedimientos estándares de cultivo celular. Crecieron en DMEM suplementadas con 2 ml de glutamina y el suero bovino fetal (FBS). El % de suero varió entre 5 y 10% según el experimento para adaptar la velocidad de crecimiento a las necesidades. Las 293 sanas adquieren la forma de fibroblastos se adhieren bien a la placa formando una monocapa. Las células infectadas perdían esta morfología, se redondeaban y morían. Las células se mantuvieron en confluencia de menos del 70%. Tras un periodo de 3 a 4 meses se descongelaron nuevos stocks celulares.

2.11. Linealización del plásmido adenoviral+ADN inserto

8,6 μg de alfa1CD ADN (86 μl) fueron digeridos con 4 μl de EcoRI, en 10 μl bufer 10x a 37°C durante toda la noche.

9 μg de alfa1CH ADN (90 μl) fueron digeridos con 4 μl de EcoRI, en 10 μl bufer 10x a 37°C durante toda la noche

Tras la digestión los plásmidos linealizados se extrajeron mediante extracción con fenol y cloroformo/alcohol isoamil (24:1). Posteriormente el ADN se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol y se resuspendió en TE.

2.12. Transfección de las células QBI-293A con el vector de transferencia recombinante.

5 μg del plasmido linealizado que contienen el ADN inserto se mezcló con 5 μg de ADN viral. Este producto se utilizó para transfectar

a las células 293A utilizando la técnica de precipitación de calcio-fosfato.

Como control positivo, se utilizó 0,5 µg de QBI-Transf+ (10 µl) con 10 µg del inserto de ADN (4 µl) y fueron transfectados en las células. Este control rindió la eficiencia de la transfección.

CONTROL TRANSFECCIÓN
Vector viral
Vector viral + ADN inserto
Inserto de ADN

2.13. Pasaje de las células 293 tras la transfección

Después de incubar las células con el ADN-calcio fosfato durante toda la noche, el sobre nadante fue retirado y la monocapa celular fue lavada una vez con 1 mM EGTA en PBS y dos veces con PBS. Las células se dividieron en platos de petri de 60mm (5 ml DMEM 5% SBF) y se dejaron durante 6 horas.

2.14. Cubrir las células transfectadas con agarosa

Después de las 6 horas el medio se retiró por completo y las células se cubrieron con 1,25% de agarosa (SeaPlaque^R agarosa, Quantum, Canada).

Se preparó un stock de agarosa (SeaplaqueR) al 5% en PBS estéril, se esterilizó y se almacenó a 0°C en alícuotas de 10 ml en tubos cónicos estériles de 50 ml. Antes de su uso, se derritió la agarosa de

en un microonda y se enfrió hasta 40°C (evitando hervir la agarose). Se agregaron 30 ml de DMEM 5 % equilibrados previamente a 37°C y se mezcló suavemente. La agarosa al 1,25%, se utilizó inmediatamente para cubrir la monocapa celular, siempre con mucho cuidado de no levantar las células.

De 1 a 2 ml de 1,25% agarosa se fue añadiendo a las placas cada 4 o 5 días.

2.15. Producción del stock primario de adenovirus

De 20-60 placas aparecieron sobre las células a los 20 días después de la transfección. Estas placas se aislaron y se realizó un escring para determinar cual de ellas correspondían al adenovirus recombinante.

5 placas fueron purificadas de la siguiente forma:

Las placas se picaron de la capa de agarosa y se diluyeron durante 24 horas a 37°C en 0.5 ml de DMEM 5% en una placa de 24 pocillos. Se tomaron 100 μ l de esta dilución del virus, que corresponde aproximadamente a 10^3 partículas del virus y se infectó a las células QBI-293A.

Las células se cultivaron para este propósito en una placa de 24 pocillos individuales (5×10^4 células/pocillo en 1 ml de DMEM al 5%) a cada pocillo se le añadió los 100 μ l de la dilución del virus. Se cultivaron las células con el virus hasta obtener el efecto citopático completo (CPE). Una vez que se obtuvo el CPE se congeló la placa entera (-20°C) y se descongeló (37°C) repitiendo el proceso 3 veces. La solución resultante fue el stock viral de la primera amplificación. Stock primario: aproximadamente 10^7 partículas del virus en 1 ml.

2.16. Escriping del adenovirus recombinante mediante PCR.

Se realizó una reacción de PCR con:

4 μ l del adenovirus stock

25 picomoles de cada primer

1 U de Taq polimerasa

Volumen total de 25 μ l

Tras 30 ciclos, los resultados se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

2.17. Pre-amplificación del adenovirus

Se plantaron 10^5 células 293A en una placa de 24 pocillos. Se le extrajo el medio a las células con cuidado y se añadieron 200 μ l del stock viral sobre la monocapa, esparciéndolo despacio mediante un movimiento de cruz. Se incubaron a 37°C en 5% CO₂ durante 90 minutos. Se le añadieron 800 μ l de DMEM y se mezcló con cuidado. Las células se mantuvieron a 37°C hasta que se completó el efecto citopático (CPE) más o menos 7 días. Se realizaron tres ciclos de congelación (-80°C, 2 horas) descongelación (37°C, hasta completar la descongelación). Los restos celulares se centrifugaron en un tubo cónico de 15 ml. El sobrenadante se conservó a -20°C. La concentración viral fue de 5×10^7 partículas virales por ml de DMEM.

2.18. Amplificación del adenovirus

Se sembraron 5×10^5 células 293A en frascos de cultivo de 75 cm². Se completó 0,5 ml del stock viral con 0,5 ml de DMEM 5% y se

mezcló suavemente. Se retiró el medio a las células y se añadió la solución viral sobre la monocapa celular y se mezcló delicadamente.

Se incubaron las células con el virus durante 90 minutos a 37°C. Se añadió 9 ml de DMEM 5% y se incubaron durante 72 horas a 37°C. Se resuspendieron en un 5 ml de medio. A continuación se realizaron tres ciclos de congelación (-80°C, 2 horas), descongelación (37°C, hasta completar la descongelación). Los restos celulares se centrifugaron en un tubo cónico de 15 ml.

El sobrenadante se conservó a -20°C. Se plantaron 3×10^7 células 293A en 3 frascos de cultivo de 175 cm² (1×10^7 células por frasco). Se mezcló 3 ml del último stock viral obtenido con 12 ml de DMEM 5%. Se extrajo el medio a las células y delicadamente se le añadieron 5 ml del lisado celular en cada frasco. Se movió con cuidado. Se incubaron las células durante 90 minutos a 37°C. Se le añadieron a cada frasco 30 ml de DMEM 5%. Se incubaron las células durante 72 horas.

Una vez que todas habían muerto se procedió como anteriormente se ha explicado. Se obtuvo de este modo el tercer stock viral. Se realizó una nueva amplificación de este stock siguiendo los pasos indicados anteriormente.

2. 19. Purificación de las partículas virales mediante doble gradiente de cloruro de cesio

2.19.1. Gradiente discontinuo

Se utilizaron tubos de celulosa/nitrato, a los que despacio se les añadió 8 ml de CsCl 1,4 (53 g + 87 ml de 10 mM Tris-HCl pH 7,9). Poco a poco, se cubrió con 6 ml de CsCl 1,2 (26,8 g + 92 ml de 10 mM Tris-HCl pH 7,9). Se cubrió paulatinamente con el stock viral. Se

centrifugó durante 90 minutos a 100 000g a 4°C. Utilizando pipetas de 10 ml, se extrajo los restos celulares que quedan en el primer gradiente. A continuación, se extrajo la capa del gradiente que contenía el virus mediante una jeringa de 5 ml con una aguja de 18G con la cual se pinchó directamente en el tubo, se aspiró el contenido de la fase viral con mucho cuidado. Se traspasó la banda viral a un tubo estéril de 15 ml y se le añadió 10 ml de 1xTE para reducir la concentración de CsCl.

2.19.2. Gradiente continuo

En un tubo de celulosa/nitrato se añadió 12 ml de CsCl 1,4 y 14 ml de CsCl 1,2. Se le cubrió con 10 ml del virus diluido y se centrifugó durante 14 horas a 100 000g a 4°C. La capa inferior de aspecto blanquecino es la que contenía el virión. Se extrajo como se ha indicado anteriormente, esta vez se pinchó en el fondo del tubo.

Se utilizó una columna sephadex G25 para extraer el CsCl.

2.20. Cálculo de título de partículas virales mediante el método: dosis de infección del cultivo (DIC50)

2.21. Dilución seriada del virus

Por duplicado se prepararon ocho diluciones seriales en tubos estériles de 5 ml. Se dispensaron 1,8 ml de DMEM 2% SBF por tubo. Se agregaron 0,2 ml del stock viral en el primer tubo. Se pipeteó arriba y abajo 5 veces para mezclar cambiando la punta de la pipeta después de cada dilución. 0,2 ml de la dilución 10^{-1} se transfirió al segundo tubo. Se repitieron las diluciones hasta obtener la dilución

más alta deseada. Se realizó una segunda tanda de diluciones utilizando el mismo stock viral.

2.22. Preparación de las células

Se colectaron las células 293A de un frasco de cultivo y se contaron. Se prepararon 20 ml de suspensión de células, alcanzando 10^5 células/ml en DMEM al 2%. Con una pipeta de 12 canales y un depósito estéril, se dispensaron 100 μ l (10^4 células) por cada pocillo de la placa de 96 pocillos. Se realizó dicho experimento por duplicado.

2.23. Distribución de la dilución viral

En cada placa de 96 pocillos se procedió como a continuación se detalla. Se dispuso una dilución viral en cada una de las filas, para lo cual se dispensaron 0,1 ml por pocillo de la dilución viral. Así del pocillo #1 al #10 tenían la misma dilución viral (10 pozos por la dilución). Las columnas #11 y 12 se utilizaron como control negativo añadiéndose únicamente 0,1 ml de DMEM al 2% a cada uno de los pocillos. Se comenzó con la dilución viral mayor en la primera fila.

Se incubaron las células con las diluciones virales a 37°C durante 10 días.

2.24. Lectura de las placas

Utilizando un microscopio invertido se leyeron las placas. Se observó el efecto citopático en cada uno de los pocillos. Se contó el efecto citopático (CPE) por fila. Mediante el método de KÄRBER se determinó el título viral.

Para 100 μ l de dilución el título fue:

$$T=10^{1+d(S+0,5)-0,7}$$

$$d= \text{Log}^{10} \text{ de la dilución}$$

$$S= \text{la suma de las ratios}$$

2.25. Infección de las células con el adenovirus

Se sembraron las células en placa de petri de 35 mm para alcanzar el 50% de confluencia en el día de la infección ($1,8 \times 10^6$ células por placa). Se añadió la MOI (multiplicidad de la infección), de 50 MOI= 50 genomas virales por cada célula. Se utilizó el stock viral nº 4, de la amplificación del virus se tiene un título viral de $1,7 \times 10^8$ PFU / ml.

Para calcular la cantidad de dilución viral que hay que añadir para obtener 50 MOI se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Número de células} \times \text{MOI} = \text{total PFU deseadas}$$

$$\text{PFU deseadas} = 9 \times 10^7$$

$$\text{ml dilución viral} = \text{PFU deseadas} / \text{PFU del título viral}$$

$$\text{ml dilución viral} = 0.5$$

Se añadió la concentración del virus apropiada a cada placa de 35 mm cubierta de células. Se incubó 24 horas a 37 °C tras lo cual se le cambió el medio a las células.

3. CULTIVOS CELULARES

3.1. Líneas Celulares

Los estudios fueron realizados en dos líneas celulares HEK-293, COS-7 y PC-12. Y células granulares de cerebelo de rata.

3.2. Cultivo de líneas celulares

Las células HEK293 fueron cultivadas en medio Eagle suplementado con 10% de de suero bovino fetal (FBS).

Las células COS7 fueron cultivadas en medio Dulbecco con 10% de FBS.

Las células PC12 fueron cultivadas en medio de RPMI suplementado con 10% de suero de caballo y 5% de FBS. La diferenciación de las células PC12 fue inducida por la adición de 50 ng/ml del factor del crecimiento del nervio (NGF, 7S) y 1 μ M de dibutilil AMP-cíclico durante 7 días.

Células granulares de cerebelo (GC). Las GC fueron obtenidas de la dispersión de 10 ratas de 10 días de vida. Los cerebelos fueron lavados con MEM una vez y tripsinizados durante 25 minutos a 37°C con movimiento continuo. El tejido fino fue triturado 20 veces y centrifugado a 100 g durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante cuidadosamente, y se añadió medio fresco para resuspender el pellet celular. Las células se sembraron en placas de Petri de 35 milímetros cubiertos con poli-lisina a una concentración de 250×10^3 células/cm². Las células fueron mantenidas en medio esencial mínimo Eagles (MEM) suplementado con 10% FBS, 20mM de glutamina y 0,04 M de KCl.

Los cultivos de células se realizaron en frascos de cultivo (Falcon) de 25 u 80 cm² de superficie útil que se mantuvieron en estufa a 37°C, atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad. Todas las manipulaciones de las líneas celulares se realizaron en esterilidad trabajando en campana de flujo laminar y utilizando material y soluciones estériles.

3.3. Congelación de las líneas celulares

Las células, despegadas de la superficie de los frascos de cultivo como se ha descrito anteriormente, fueron centrifugadas en frascos de 25 ml estériles a 1500 rpm durante 5 min y fueron lavadas 2 veces con PBS. Tras retirar el sobrenadante, se resuspendieron en medio de congelación a razón de 0.5×10^6 células por ml. A continuación fueron dispensadas en criotubos e introducidas inmediatamente en congelador a -80°C donde permanecieron 24 h, siendo almacenadas después indefinidamente en nitrógeno líquido.

Medio de congelación: suero fetal bovino (Sigma, SL), inactivado en calor húmedo a 56°C durante 30 min, y dimetil sulfóxido (DMSO) al 10%.

3.4. Descongelación de las líneas celulares

Las líneas celulares (en criotubos y almacenadas en nitrógeno líquido), fueron descongeladas en calor húmedo a 37°C. Posteriormente, en una cabina de flujo laminar, las células fueron lavadas 2 veces con PBS estéril para eliminar los restos de DMSO,

resuspendidas en medio de cultivo previamente filtrado y depositadas en frascos de cultivo.

4. TRANSFECCIÓN DE VECTORES EN CÉLULAS EUCARIÓTICAS

4.1. Método de transfección

Las células fueron sembradas en placas de Petri de 35 milímetros cubiertas con poly-D-lysine y transfectadas con los métodos mencionados a continuación siguiendo las instrucciones que se detallan. Las células fueron analizadas 48 horas después de la transfección.

Las transfecciones control fueron realizadas con vector solamente. Cada transfección se realizó por duplicado.

4.1.1. Transfecciones mediadas por liposomas.

Se probaran los siguientes reactivos: Lipofectamina; ESCORT; TfxTM-50.

a) Lipofectamina

La Lipofectamina es un reactivo de transfección de tipo liposomal, con una formulación de 3:1 (w/w) del lípido policationico DOSPA y del lípido neutral DOPE. Este reactivo fue utilizado para transfectar transitoriamente ADN en las líneas celulares y en las neuronas granulares de cerebelo. Las células fueron plantadas en al 50% de confluencia en portas de cristal o sobre placas de petri de 35 mm ambas cubiertas con poli-lisina, de modo que en el día de la

transfección las células estuvieran aproximadamente al 70% de confluencia.

Las células granulares de cerebelo de rata tras la disociación y dispersión celular fueron sembradas (250×10^3 células/cm²) sobre placas de petri de 35 mm cubiertas con poli-lisina.

Para cada transfección se prepararon dos tubos estériles de 12 x 75 ml que contenían:

Tubo 1: 1-2 μ g de ADN fueron diluidos en 100 μ l de medio sin suero de crecimiento.

Tubo 2: 5 μ l (10 μ g) de Lipofectamina (GIBCO BRL) se diluyó en 100 μ l de medio sin suero de crecimiento.

Las dos soluciones fueron combinadas, mezcladas suavemente e incubadas a temperatura ambiente durante 45 minutos para permitir que los complejos de ADN-liposomas se formasen. Después de lo cual se agregó 800 μ l de medio sin suero. Las células se lavaron una vez con 2 ml de medio sin suero y la mezcla de ADN-liposomas se añadió gota a gota. Las células se incubaron durante 3-5 horas a 37 °C con 5 % CO₂. Las células se lavaron una vez con medio completo y se incubaron durante 12-24 horas con medio completo.

b) Reactivo de transfección ESCORT

El ESCORT (SIGMA) es un reactivo de base liposomal cuya formulación comprende los lípidos catiónicos DOTAP y DOPE en una razón de 1:1 (w/w).

Este reactivo se utilizó de la misma forma que lo descrito anteriormente para la Lipofectamina, con la única excepción que el tiempo de incubación para permitir la formación del complejo ADN/liposomas fue de 15 min.

c) Reactivo TfxTM-50

El reactivo TfxTM-50 (PROMEGA) es una mezcla de una molécula catiónica sintética y DOPE, como una película lipídica seca. Dicha película mediante rehidratación con agua, forma vesículas lipídicas multilaminales que se asocian a los ácidos nucleicos. El reactivo TfxTM-50 fue utilizado con las líneas celulares nombradas y con las células de cerebelo de rata inmediatamente tras dispersión o mantenidas en cultivo.

El procedimiento seguido fue el recomendado por el fabricante con algunas modificaciones, brevemente: El día antes de la transfección un frasco del reactivo TfxTM-50 fue calentado a 37 °C, reconstituido con 400 µl de agua y mezclado vigorosamente durante 10 segundos para re-suspender de nuevo la película lipídica. A continuación, el frasco fue colocado en un baño de agua a 65 °C durante 1 minuto, se mezcló de nuevo y se almacenó a -20°C durante toda la noche. A 200 µl de medio sin suero se le añadió: 2 µg de ADN y 9 µl del reactivo TfxTM-50.

La mezcla fue colocada a temperatura ambiente durante 45 minutos para permitir que el lípido y el ADN se asociaran. Las células se lavaron dos veces con 2 ml de medio sin suero. Se retiró el medio a las células y se añadieron 800 µl de medio sin suero a la mezcla de lípido/ADN. Dicha mezcla se añadió a cada cultivo celular. Las células fueron incubadas a 37 °C durante 2 horas. A continuación, fueron cubiertas suavemente con 2-3 ml de medio completo y incubadas en la estufa durante 48 horas.

4.1.2. Electroporación

Las células fueron tripsinizadas, contadas y mantenidas en medio sin suero a temperatura ambiente. 20 µg de ADN fue puesto en una

cubeta fría mantenida sobre hielo a la cual se le añadieron 400 μl de las células ($1-5 \times 10^7$). La cubeta se incubó sobre hielo durante 3-5 minutos. Antes de la electroporación, las células fueron suspendidas de nuevo con una pipeta Pasteur estéril. Se utilizó un electroporador (Electro Cell Manipulator) y se les expuso a las células a un pulso de 260 V. Las células fueron incubadas de nuevo en el hielo durante 1-2 minutos y se le añadieron 400 μl de medio sin suero. Luego se plantaron con una densidad de 100-150 cells/cm² e incubadas durante 2-4 horas, tras lo cual el medio fue substituido por medio completo. Las células fueron mantenidas en la estufa con 5% de CO₂ durante 48 horas antes de la experimentación.

4.1.3. Técnica de precipitación de calcio-fosfato

La precipitación de calcio fosfato del calcio fue utilizada en las líneas celulares (HEK293, COS7 y PC12) y en las células granulares de cerebelo de rata enseguida después de que fueron disociadas o después de mantenerlas en cultivo primario, según se describe a continuación.

Para cada transfección se prepararon dos tubos con las soluciones siguientes:

Tubo 1: 5 μg de ADN diluido en 50 μl de TE 0.1x estéril TE al que se añadió 169 μl de ddH₂O y 5 μl de CaCl₂ (2 M). Se mezcló con una pipeta aspirando y expulsando dos veces.

Tubo 2: 250 μl de 2x HBS.

La solución I se añadió gota a gota a la solución II con agitación suave, y se incubó durante 20-30 minutos a temperatura ambiente para permitir que se formase el precipitado de calcio fosfato: cADN. El precipitado fue entonces añadido gota a gota sobre el medio que

cubría las células. Las células se incubaron durante toda la noche. Las células se lavaron con medio completo y se incubaron durante 24 horas antes de la experimentación.

5. Seguimientos de partículas individuales tras marcarlas con fluorescencia (SPT)

La técnica de seguimiento individual de partículas (SPT) se empleó para estudiar la dinámica de membrana de receptores recombinantes expresados en la línea celular COS7.

En primer lugar se construyeron los marcadores de SPT para lo cual fue usado el fluoro-microesferas de 50-100 nm (Molecular Probes, Holanada). A esos marcadores, se les unió covalentemente los anticuerpos específicos para las sub-unidades alfa1 y beta3 del receptor de GABA.

Se utilizaron fragmentos Fab' de dichos anticuerpos (del anticuerpo bd24 para alfa1 y del anticuerpo bd17 para beta3, Boehringer, Alemania), para evitar posibles problemas de "crosslinking" entre los anticuerpos, que pudieran falsear los resultados.

Se denominaron a estas fluoro-esferas a1-FS para alfa1 y b3-FS para beta3.

Las fluoro-microesferas unidas a los fragmentos Fab de los anticuerpos mencionados, fueron utilizadas para seguir el movimiento de un único complejo de receptor recombinante sobre la superficie de célula en tiempo real.

5.1. Calibración del microscopio.

Los experimentos de SPT fueron realizados con un microscopio invertido modificado Olympus IX71. Estas modificaciones incluyeron un compartimiento de incubación para mantener a las células a una temperatura constante de 37°C, un objetivo de 100X con una apertura de 1,3 NA del tipo de reflexión total de la fluorescencia interna (Photonics, Grafeling, Alemania), y un monocromador para la excitación de la epi-fluorescencia con un regulador que permitía cambiar de forma rápida y controlada, mediante un hardware, la reflexión total de la fluorescencia interna y la de epi-fluorescencia de excitación y adquisición (TILL Photonics). El haz del láser (488-568-568-nm) así como, el haz del monocromador, se unieron a través de fibras ópticas por medio de un condensador del microscopio (TILL Photonics).

Las imágenes fueron adquiridas usando una cámara de vídeo QE adaptada al microscopio (TILL Photonics) y procesadas mediante el software de TILLVISION (TILL Photonics). El ángulo interno de reflexión total fue ajustado manualmente según cada experimento.

5.2. Procedimiento

Se transfectaron a las células COS7 con la subunidad beta3 del receptor GABA y se comparó la dinámica de los receptores expresados con la de receptores expresados al co-transfectar a las células con las subunidades alfa1 y beta3. Tras la transfección las células COS7 fueron marcadas con a1-FS o b3-FS según procediese.

Las células positivas se identificaron por medio del objetivo 100X.

Los movimientos de las fluoroesferas individuales se siguieron por medio de video microscopía de alta resolución y procesadas por el

software de TILLVISION mencionado anteriormente. La resolución del movimiento de los receptores bajo las condiciones usadas para estos experimentos fue de $7,5 \pm 0,4$ nm y limitada sobre todo por las distorsiones de la cámara fotográfica.

Capítulo IV

RESULTADOS

1. COMPARACIÓN DE LA EFICIENCIA DE DIFERENTES MÉTODOS DE TRANSEFECCIÓN

Se realizó un estudio pormenorizado y comparativo de la eficiencia de diferentes métodos de transfección en diferentes líneas celulares. Para ello se transfectaron las líneas celulares de HEK 293, COS7 y PC12. Estudios paralelos se llevaron a cabo con células neuronales extraídas del cerebelo de rata: células granulares de cerebelo.

Se probaron las siguientes técnicas de transfección:

a) Transfecciones mediadas por liposomas.

-Lipofectamina

-ESCORT

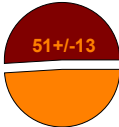


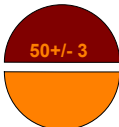
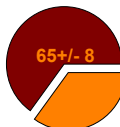

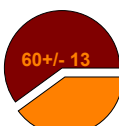
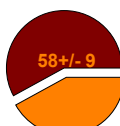
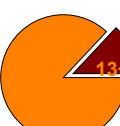
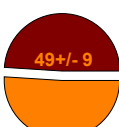
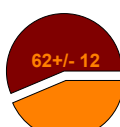



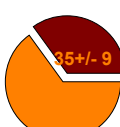
-TfxTM-50

b) Electroporación

c) Técnica de precipitación de calcio-fosfato

La eficiencia de la transfección fue determinada mediante inmunocitoquímica. Tras transfectar las células con la subunidad beta3 de los receptores GABA se calculó la eficiencia de la transfección contando el número de células que expresaban dicha subunidad tras marcarlas con el anticuerpo específico bd17.

Tabla 5 Muestra la eficiencia de transfección de 5 tratamientos diferentes probados en tres líneas celulares, HEK293; COS7 y PC12.

	HEK293	COS7	PC12
LIPOFECTAMINA			
ESCORT			
Tfx TM-50			
P.CALCIO/ FOSFATO			
ELECTROPORACIÓN			

1.1. Medida de la eficiencia de transfección de diferentes métodos en células no neuronales.

En la tabla 5 se resumen los resultados obtenidos al probar los diferentes métodos de transfección en las células HEK293, COS7 y PC12. Los métodos de transfección basados en la técnica de utilización de liposomas resultaron ser los más eficientes a la hora de transfectar a las células, llegándose a alcanzar valores de hasta un 65% de células COS7 transfectadas al usar el reactivo liposomal ESCORT, en la Figura 10 se muestran COS7 transfectadas por medio de ESCORT y visualizadas por el anticuerpo bd17.

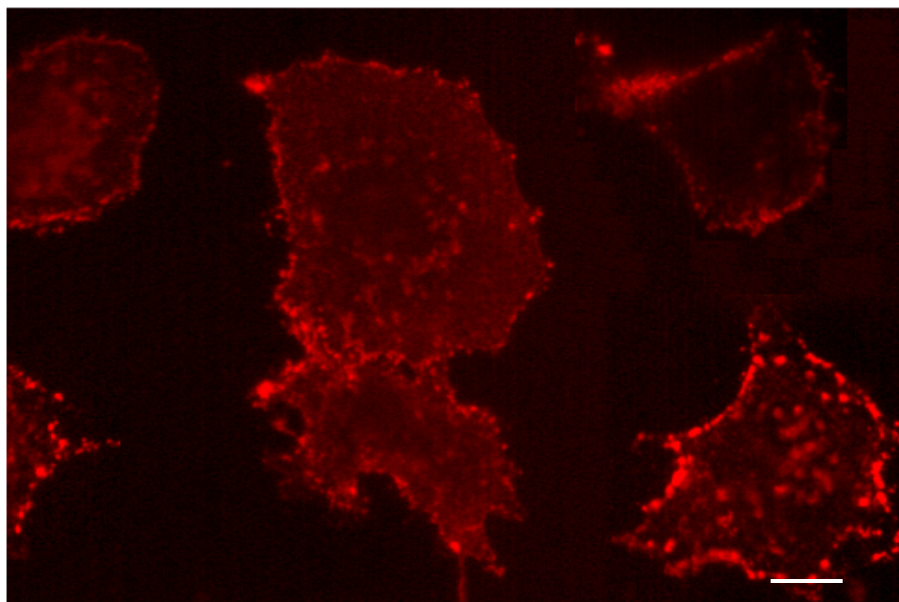


Figura 10. *Células COS7 transfectadas con la subunidad beta3 de los receptores GABA mediante el reactivo liposomal ESCORT y visualizadas mediante el anticuerpo bd17. Barra de escala: 20 μ m.*

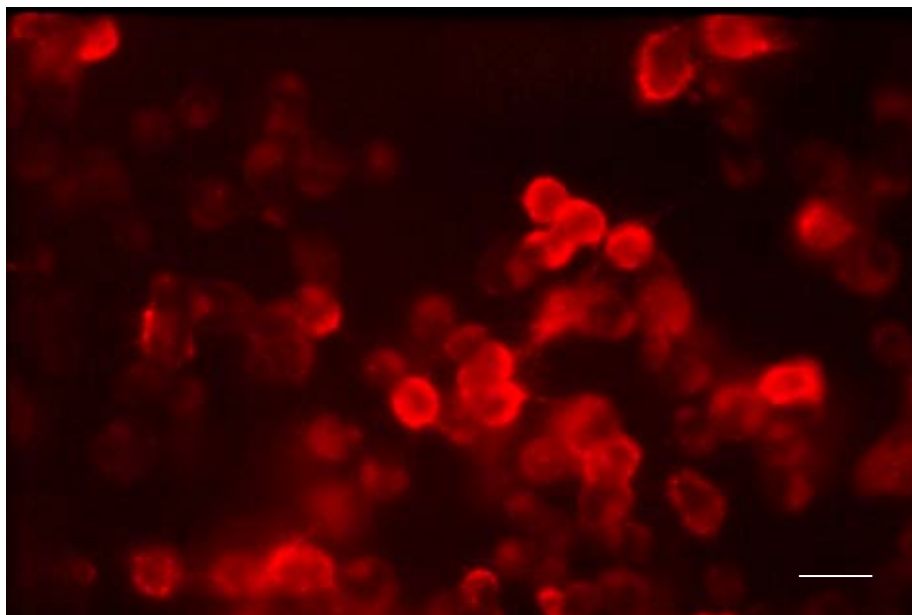
La eficiencia de transfección para las células HEK293 alcanzó su valor más alto (60%) al utilizar el reactivo liposomal Tfx TM-50, en la Figura 11 se aprecian células HEK293 transfectadas por medio de dicho reactivo y visualizadas por el anticuerpo bd17. En el panel B de la dicha figura se muestra una ampliación de las células del panel A. En esta fotografía se puede apreciar claramente la distribución en grupos de los receptores expresados.

Las células HEK293 y COS7 resultaron ser altamente transfectables con la mayoría de los métodos probados, sin embargo las células PC12 mostraron tasas de transfección del orden del 10 al 20%, exceptuando el 35% de transfección conseguido por la técnica de electroporación (Figura 12). Este resultado no fue inesperado ya que las células PC12 son una línea celular derivada a partir de un feocromocitoma de la médula suprarrenal de la rata. Estas células, en cultivo, mantienen un fenotipo redondeado, creciendo en suspensión. Una vez que se les trata con factores de crecimiento nerviosos detienen su división y experimentan una diferenciación terminal adquiriendo la morfología de una neurona, lo que hace que esta línea sea un modelo útil para el estudio de células nerviosas. Sus características neuronales las hacen sin embargo difíciles de transfectar. En este estudio se transfectaron células PC12 una vez que habían sido tratadas con factores nerviosos.

En la Figura 12 se presentan células PC12 diferenciadas que han sido transfectadas mediante electroporación con la subunidad beta 3 del receptor GABA. Tras la transfección las células se marcaron con el

anticuerpo bd17 y se visualizaron con el anticuerpo secundario conjugado con FITC.

PANEL A



PANEL B

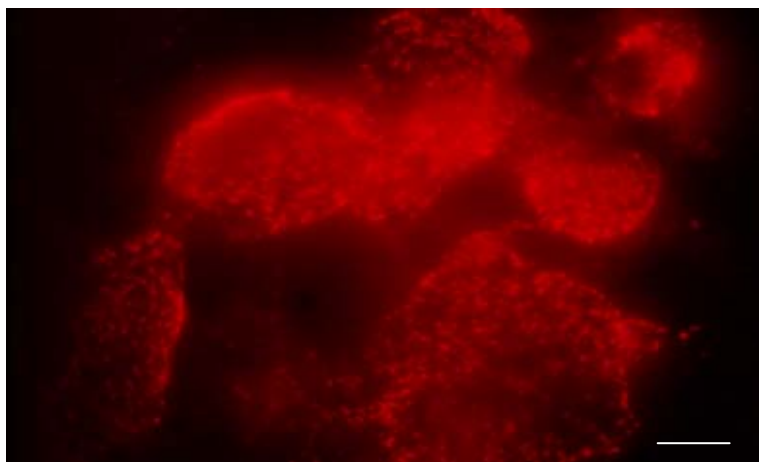


Figura 11. Panel A, células HEK293 transfectadas con la subunidad beta3 del receptor GABA mediante el reactivo liposomal Tfx TM-50 y visualizadas mediante el anticuerpo bd17. Panel B: muestra una magnificación (objetivo 100x) de un grupo de células del panel A

(objetivo 40x) donde se aprecia la disposición en grupos de los receptores expresados. Barra de escala Panel A: 10 μ m; Panel B: 2,5 μ m

En la figura 12 se aprecian las prolongaciones que presentan las células PC12 al ser tratadas con el factor de crecimiento nervioso, la subunidad beta3 del receptor GABA se dispone sobre toda la superficie celular.

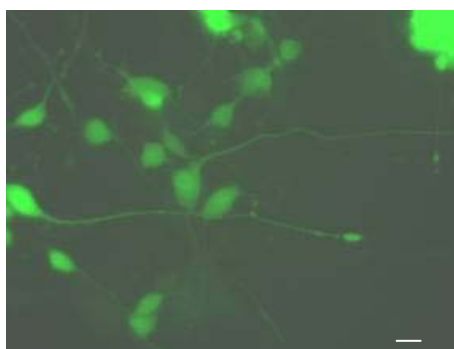


Figura 12. Células PC12 transfectadas con la subunidad beta3 de los receptores GABA mediante el método de electroporación y visualizadas mediante el anticuerpo bd17. Barra de escala 10 μ m

Los resultados de eficiencia de transfección no son tal altos como los encontrados en la literatura, o como aquellos que prometen las casas comerciales en sus boletines informativos, ya que éstos son el fruto de una optimización máxima de cada uno de los métodos de transfección, a la vez de una valoración más que positiva de los mismos. En nuestro estudio hemos realizado una comparación de los distintos métodos y presentamos resultados realistas de la eficiencia

de cada uno de ellos teniendo en cuenta que la transfección en los laboratorios de investigación es un método para conseguir una respuesta y no un fin en si mismos. Por lo tanto nuestros resultados pueden servir de guía a la hora de seleccionar que método de transfección puede ser el más adecuado para realizar un estudio concreto.

1.2. Medida de la eficiencia de transfección de diferentes métodos en células neuronales.

Se probó la eficacia de transfección de los métodos anteriormente mencionados en células neuronales. Para lo cual se utilizaron células granulares de cerebelo de rata. Los experimentos de transfección se realizaron para cada método con células obtenidas inmediatamente tras la dispersión celular y con células que habían sido mantenidas en cultivo durante una media de 4 días.

En la Tabla 6 se sumarizan los resultados obtenidos. La eficacia de la transfección de neuronas con lo métodos probados resulto ser muy baja alcanzándose el valor más alto (2%) con el método liposomal TfxTM-50.

Tabla 6. Resumen de la eficiencia de transfección de 4 métodos diferentes en neuronas del cerebelo de rata, inmediatamente tras la dispersión celular o en células mantenidas en cultivo primario

	Tras Dispersión	En cultivo
P. Calcio-fosfato	0%	0%
Electroporación	0.01%	0.02%

Lipofectamina	0.1%	0.2%
TfxTM-50	1.8%	2%

Estos resultados motivaron la necesidad de buscar una alternativa para lograr una eficiencia de transfección de células neuronales que nos permitiera realizar los estudios de dinámica de receptores GABA en neuronas. Para lo cual se realizó la construcción de un adenovirus recombinante

2. CONSTRUCCIÓN DEL ADENOVIRUS RECOMBINANTE

Se realizó la construcción de un adenovirus recombinante para utilizar como sistema de transfección en neuronas en el que se le introdujo el gen que codifica para dos subunidades quiméricas del receptor GABA.

1.2. Subunidad alfa1 bovino/rata quimera (alfa1CH) o subunidad manipulada de alfa1 compuesta por la región 5' terminal del ADN de la subunidad alfa1 bovina y la región 3' terminal del ADN de la subunidad alfa1 de rata.

1.3. Subunidad alfa1 bovino/rata con el lazo citoplasmático escindido (alfa1CD), donde la subunidad alfa1 bovino/rata quimera (alfa1CH) se trató con enzimas de restricción para escindir la región citoplasmática M3/M4.

Cada uno de los pasos seguidos para obtener el adenovirus recombinante fue verificado por medio de electroforesis en gel de

agarosa. A continuación se detallan los resultados obtenidos en cada una de las etapas de la construcción del adenovirus recombinante.

2.1. Introducción de sitios de corte para las enzimas BglII y PmeI en el ADN de las quimeras

Mediante PCR, tal y como se indica en le sección de material y métodos, y utilizando los siguientes primers:

5´ - GCAAGAAGATCTATGAAGAAAAGTCCGGGT- 3´

5´ - AGCTTTGTTTAAACTTAAGACAGAGGCAGTAAGGC- 3´

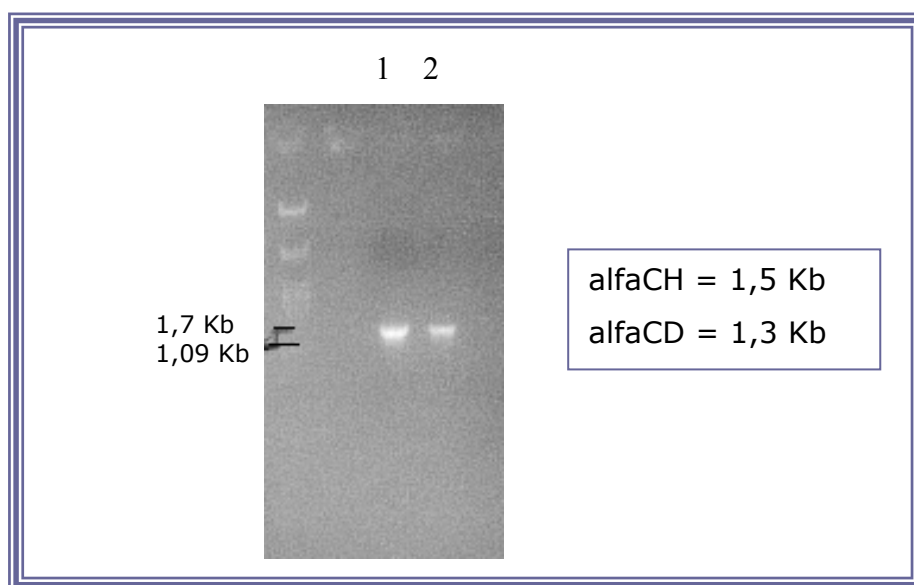


Figura 13. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio con el resultado de la reacción de PCR para introducir los sitios de corte para las enzimas de restricción BglII y PmI dentro de las subunidades quimeras *alfa1CH(1)* y *alfa1CD (2)*.

Se introdujeron sitios de corte para las enzimas de restricción BglII y PmI dentro de las subunidades quimeras alfa1CH y alfa1CD. Con la introducción de estos nuevos sitios de corte en las quimeras, nos aseguramos que nuestro ADN se ligara con la orientación apropiada dentro del vector del adenovirus, tras someterlos a una reacción de extremos cohesivos.

En la Figura 13 se muestran los resultados de la reacción de PCR tras someterlos a una electroforesis en gel de agarosa.

2.2. Digestión de los productos de PCR

Los productos obtenidos mediante PCR fueron comprobados mediante digestión enzimática con los enzimas de restricción: BamHI; EcoRI; XhoI; DraI y NdeI. Los fragmentos de ADN esperados tras la digestión de la quimera alfa1CH y alfa1CD se presentan en las Tabla 7 y 8 respectivamente. Se muestra los geles de electroforesis (Figura 14 y 15) en los que se verificó que las digestiones con cada uno de los enzimas rindieron los fragmentos esperados.

Tabla 7. *Tamaño de los fragmentos de ADN esperados tras la digestión con BamHI; EcoRI; XhoI; DraI y NdeI de la quimera alfa1CH*

Alfa1CH	Sin cortar	BamHI	EcoRI	XhoI	DraI	NdeI
Kb	1,5	1,3 0,5	1,6 0,12	No corta	0,5 1 0,2	1,3 0,5
Líneas gel	1	2	3	4	5	6

Tabla 8. *Tamaño de los fragmentos de ADN esperados tras la digestión con BamHI; EcoRI; XhoI; DraI y NdeI de la quimera alfa1CD*

Alfa1CD	Sin cortar	BamHI	EcoRI	XhoI	DraI	NdeI
Kb	1,3	1 0,2	No corta	1,1 0,2	0,8 0,3 0,2	No corta
Líneas gel	1	2	3	4	5	6

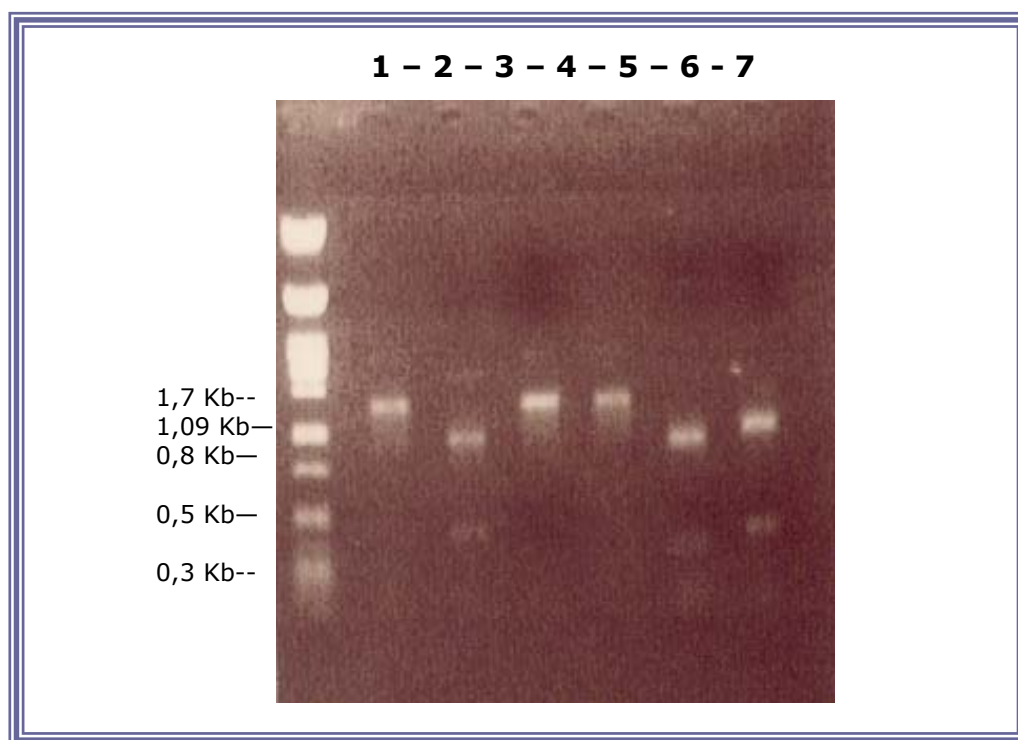


Figura 14. *Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio con el resultado de la de la digestión enzimática de la subunidad quimera alfa1CH*

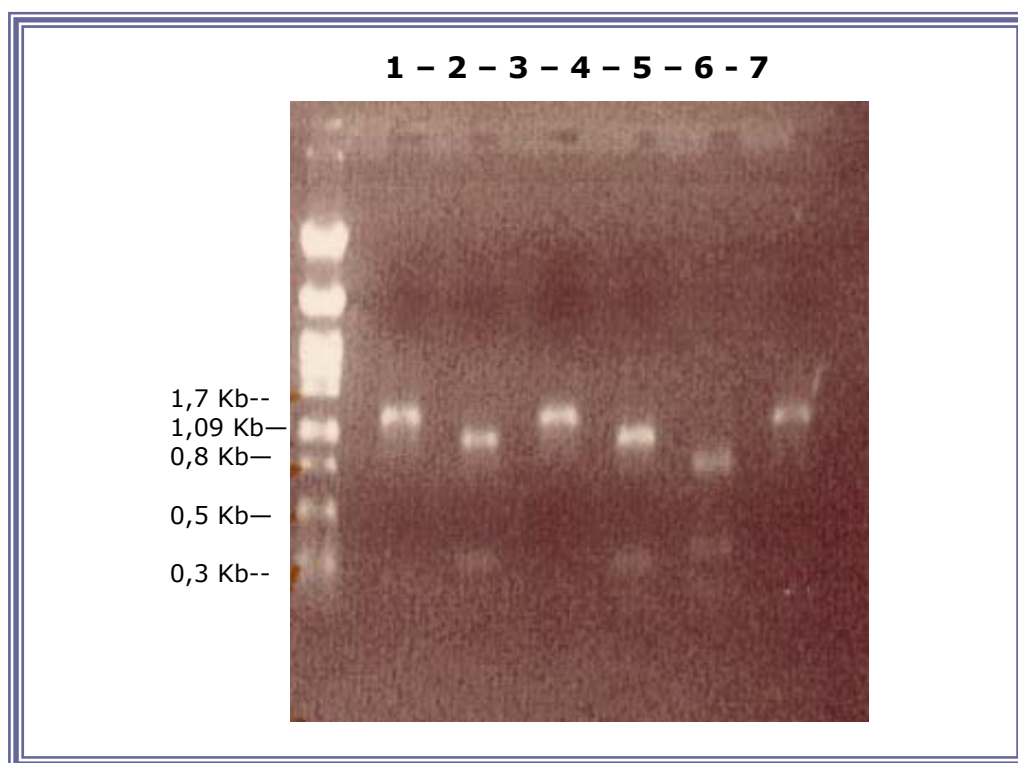


Figura 15. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio con el resultado de la de la digestión enzimática de la subunidad quimera *alfa1CD*

2.3. Digestión y purificación en electroforesis en gel de agarosa de las subunidades alfa1 quiméricas

Para preparar a las subunidades alfa1 quimeras para su posterior ligación en la dirección adecuada con el vector del adenovirus las mismas fueron digeridas con las encimas de restricción BglII y PmI.

Posteriormente se procedió a la purificación del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 16).



Figura 16. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio con el resultado de la de la digestión enzimática de la subunidades quimeras alfa1CD (1,5 Kb) y alfa1CD (1,3 Kb)

2.4. Vector viral

El vector utilizado fue el plásmido recombinante pQBI-AdCMV5-BFP (Quantum, Canada), Figura 17. El mapa de restricción completo se muestra en el Anexo I.

Este plásmido contiene el promotor CMV5, seguido de una secuencia para multiconaje. Este plásmido contiene también un gen para la proteína azul fluorescente (BFP) bajo el control del promotor CMV. La proteína azul fluorescente (BFP) contiene mutaciones silenciosas que dan lugar a una proteína con un único pico de excitación a 387 nm y un máximo pico de emisión a 450 nm.

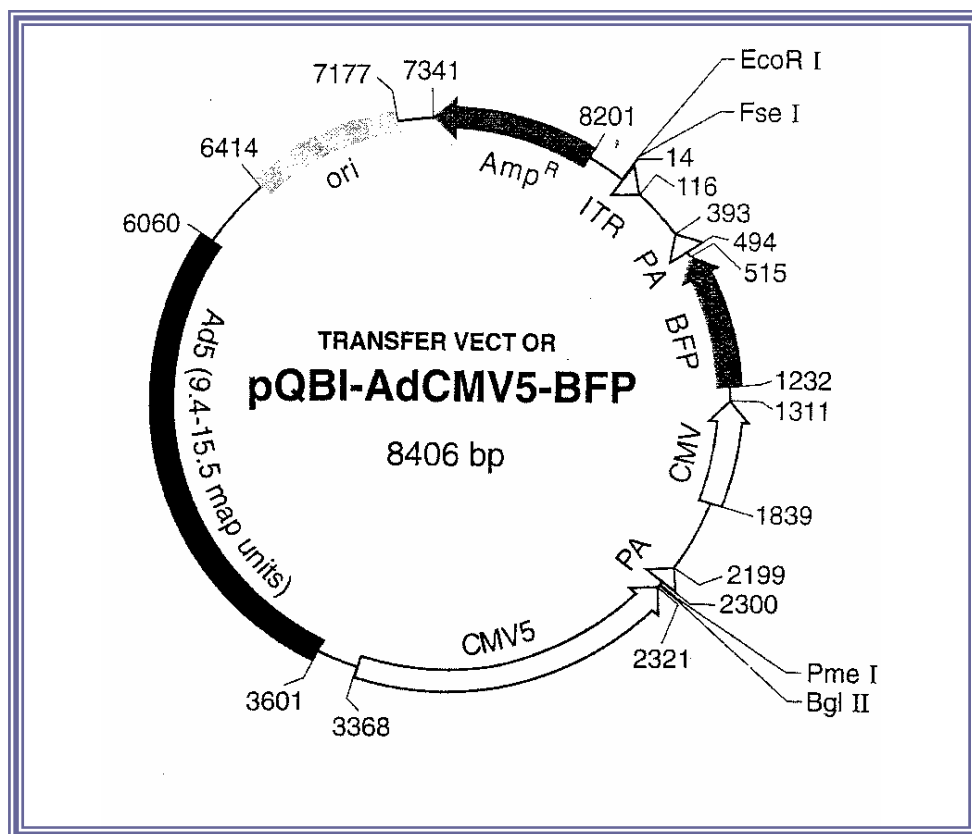


Figura 17. Mapa de restricción del plásmido recombinante pQBI-AdCMV5-BFP

2.5. Digestión y purificación en electroforesis en gel de agarosa del plásmido recombinante pQBI-AdCMV5-BFP

El plásmido fue digerido con las endonucleasas de restricción BglII y PmeI. Se comprobó primero que la enzima BglII podía trabajar con el bufer número 4 que es el apropiado para la enzima PmeI (Figura 18-A). Posteriormente se procedió a la digestión del vector pQBI-AdCMV5-BFP con la enzima BglII y la enzima PmeI en bufer nº4 (Fig. 18-B).

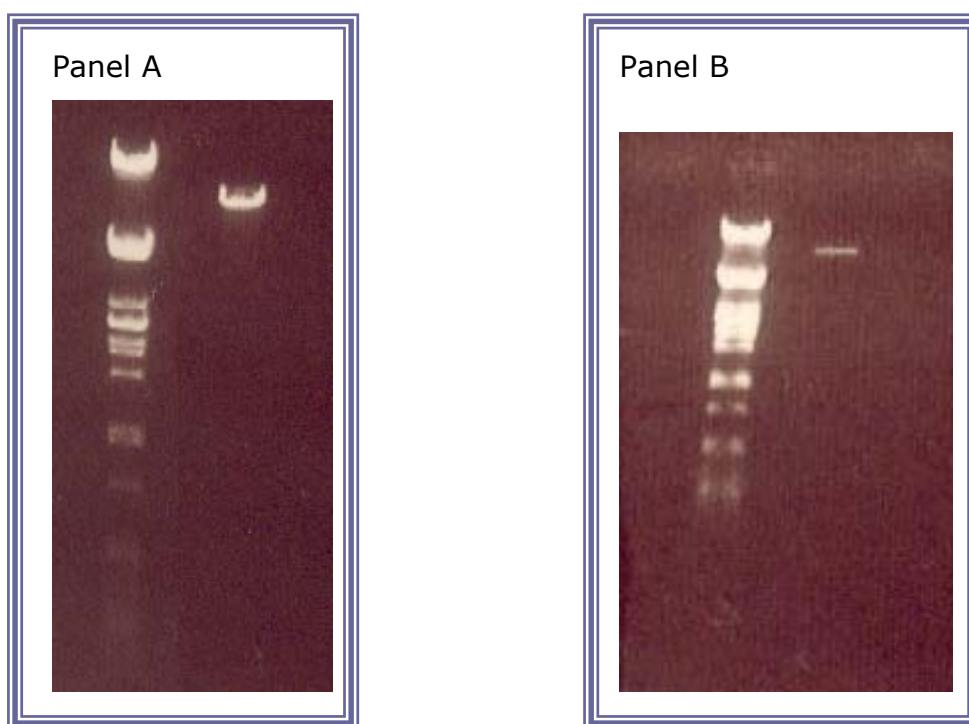


Figura 18. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Panel A: resultado de la de la digestión enzimática del vector pQBI-AdCMV5-BFP con la enzima BglII en bufer nº4. Panel B: digestión encimática del vector pQBI-AdCMV5-BFP con las enzimas BglII y PmeI en bufer nº4

2.6. Purificación del vector pQBI-AdCMV5-BFP por electroforesis en gel de agarosa

Una vez digerido el vector con las endonucleasas de restricción BglII y PmeI este fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Posteriormente la banda obtenida fue purificada utilizando el Kit Gene-clean (Figura 19).

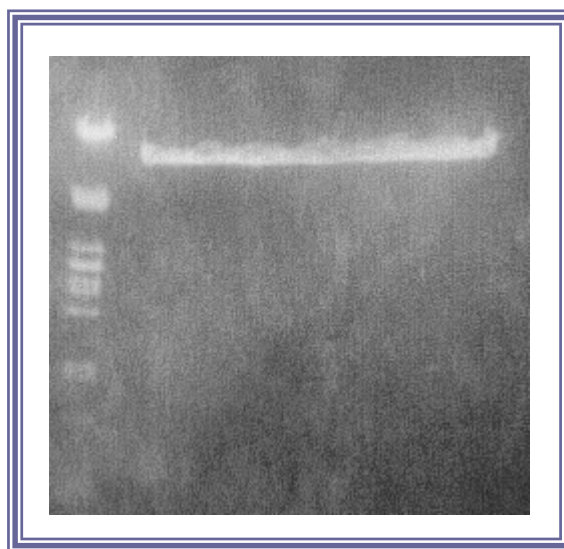


Figura 19. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio del resultado de la de la digestión enzimática del vector pQBI-AdCMV5-BFP con las enzimas BglII y PmeI para su posterior purificación.

2.7. Clonación del ADN en el vector de transferencia del adenovirus

El vector y el inserto se sometieron a una reacción de ligación de extremos cohesivos. El corte con las mismas enzimas de restricción,

permitió la orientación adecuada de los insertos. Para la construcción del vector recombinante del adenovirus se utilizó la razón de 2 moléculas de ADN por cada molécula de vector de transferencia.

Tabla 9. *Controles de la ligación del ADN en el vector de transferencia del adenovirus*

	Adenovirus/ vector	ADN Inserto	Vector pCU19
Reacción (R)	+	+	-
Control 1 (C1)	+	-	-
Control 2 (C2)	-	+	-
Control 3 (C3)	-	-	+

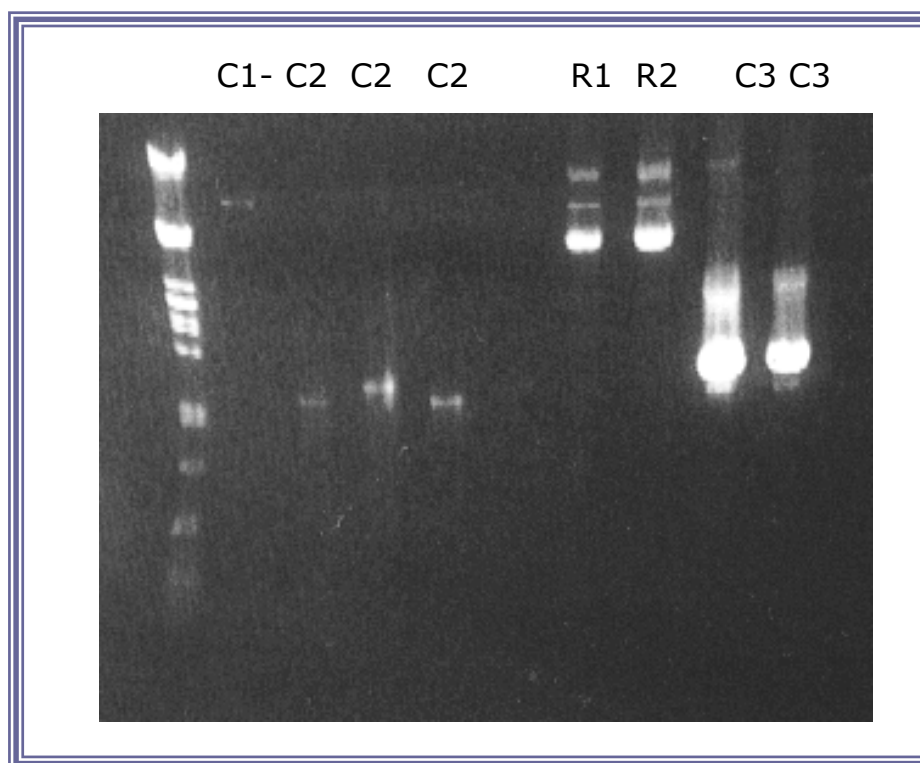


Figura 20. *Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio del resultado de la ligación del inserto de ADN alfa1CH (R1) y alfa1CD (R2) con el vector pQBI-AdCMV5-BFP. C1-C3 representan los controles realizados detallados en la Tabla 9.*

Se realizaron los controles de ligación que se señalan en la Tabla 9. En la Figura 20 se muestra la electroforesis en gel de agarosa de los resultados de la ligación del inserto de ADN alfa1CH (R1) y alfa1CD (R2) con el vector pQBI-AdCMV5-BFP así como de los controles realizados.

2.8. Preparación del vector de transferencia recombinante.

Una vez se ligó el ADN dentro del vector de transfección se realizó una digestión para determinar la correcta orientación del ADN insertado.

2.9. Transformación de bacterias competentes y obtención de cepas con el resultado de la ligación adenovirus vector+ADN inserto.

Con el resultado de la ligación se transformaron bacterias competentes. Tras cultivo de las bacterias competentes transformadas con el ADN obtenido de la ligación adenovirus vector+inserto (alfa1CH o alfa1CD) en placa de LB agar, se purificaron 27 colonias.

Se realizó la extracción de ADN de las 27 colonias y el resultado se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 21).

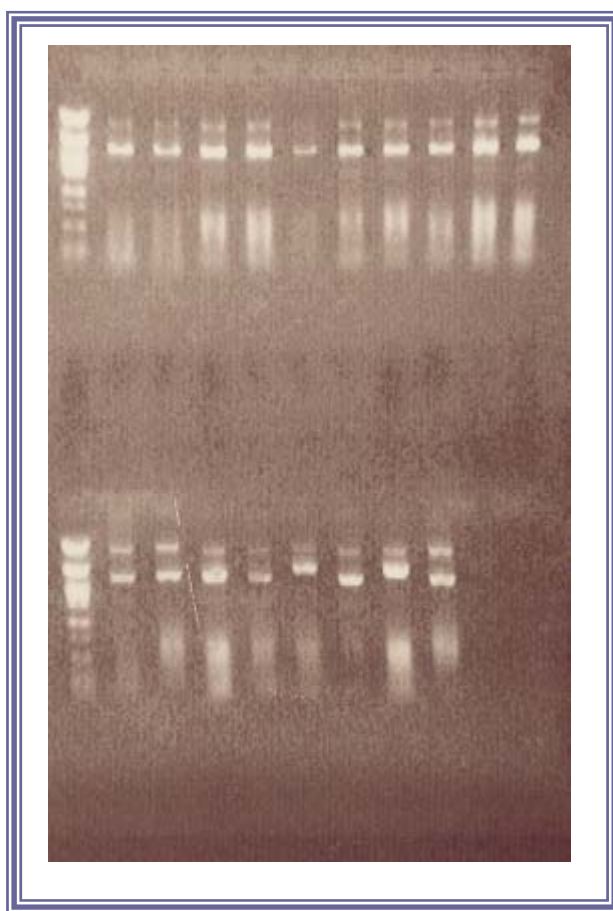


Figura 21. *Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio del resultado de la extracción del ADN de 27 colonias bacterianas producto de la transformación de E.colli con el producto de ligación.*

2.10. Linealización del plásmido adenoviral+ADN inserto

El plásmido adenoviral que contiene el inserto alfa1CH o alfa1CD fue linealizado con la enzima de restricción EcoRI.

El resultado de la digestión se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 22).

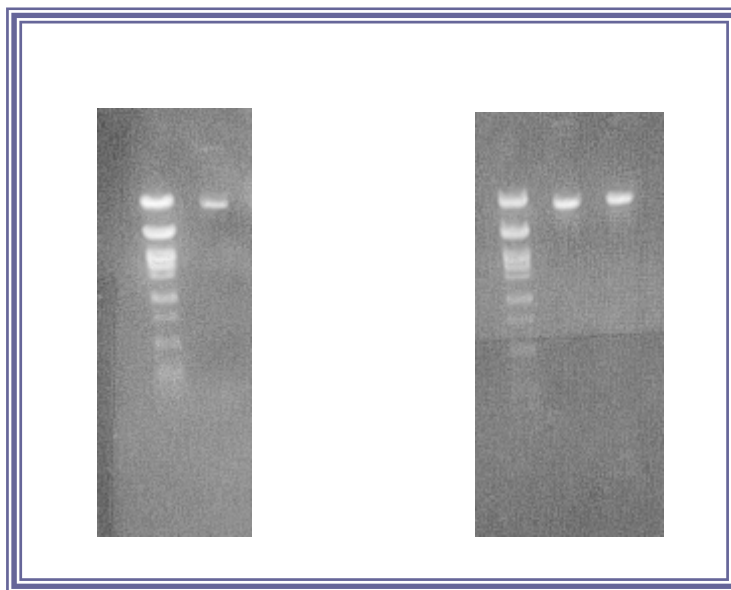


Figura 22. *Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio del resultadote la linelización del plásmido adenoviral+ inserto alfa1CH o alfa1CD mediante EcoRI.*

2.11. Obtención de colonias del adenovirus recombinante mediante transfección de las células QBI-293A con el vector de transferecia recombinante junto al ADN viral.

El segundo paso de la construcción del adenovirus recombinante es la recombinación homóloga del vector linealizado y el genoma del adenovirus para dar lugar a la formación de un adenovirus recombinante completo. Dicha recombinación se obtiene mediante la

cotransfección de células 293A con el vector linealizado que contienen el DNA a transfectar, junto al brazo largo del vector adenoviral. La recombinación homóloga da lugar a la pérdida de la región E1 viral, indispensable para su replicación. Por lo tanto estos adenovirus necesitan que se les suministre la región E1 para poner replicarse. Esto se consigue mediante la línea celular 293A, a la que se ha transfectado de modo estable con la región E1 del adenovirus. Los virus recombinantes resultantes pueden ya multiplicarse y formar colonias sobre la monocapa de células 293 mantenida en medio con agarosa (Figura 23).

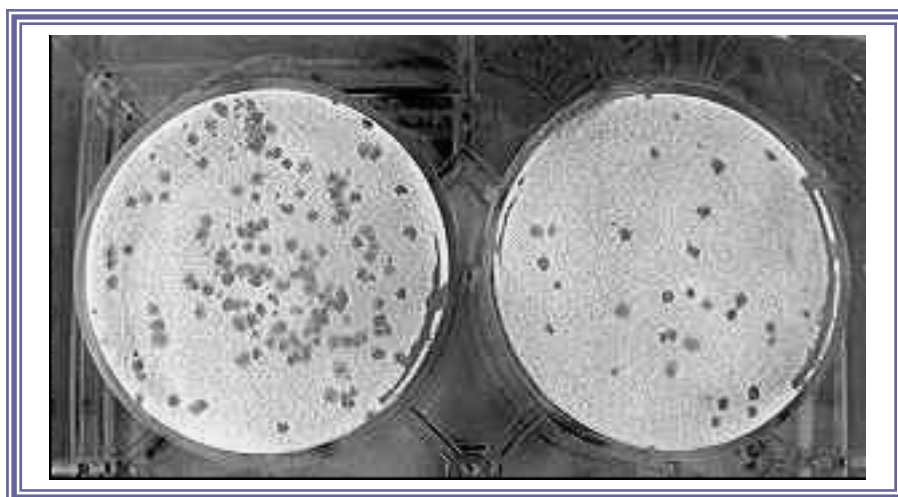


Figura 23. *Células QBI-293A cubiertas con agarosa sobre las que crecen colonias del adenovirus recombinante.*

De 20-80 colonias del adenovirus recombinante aparecieron sobre las células a los 20 días después de la transfección (Figura 23). Algunas de estas colonias fueron aisladas y se realizó un escrining para determinar cuales de ellas correspondían al adenovirus recombinante. Se constituyó así el primer stock del adenovirus.

2.12. Pre-amplificación del adenovirus

Se infectó a las células 293A mantenidas en una placa de 24 pocillos con el primer stock viral. Las células se mantuvieron a 37°C hasta que se completó el efecto citopático (CPE) más o menos 7 días. Una vez que las células presentaron el aspecto redondeado que se muestra en la Figura 24, se extrajo el adenovirus recombinante mediante ciclos de descongelación/congelación. Se estima que la concentración viral en este paso fue de 5×10^7 partículas virales por ml de DMEM.

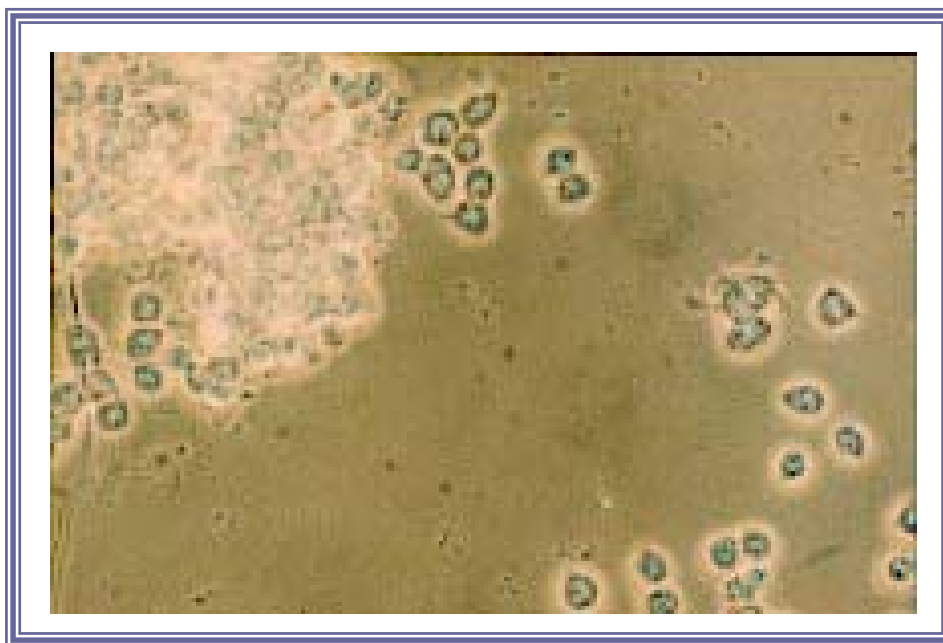


Figura 24. Se muestra el efecto citopático del adenovirus. Las células pierden su aspecto de fibroblastos, se redondean y mueren.

2.13. Amplificación del adenovirus

Se realizaron varios ciclos de amplificación del adenovirus tal y como se describe en material y métodos.

La tabla 10 resume la infectividad de cada uno de los stocks víricos obtenidos para cada ciclo de amplificación.

Donde MOI es la multiplicidad de la infección, el número de genomas virales que hay por cada célula

PFU = Unidades de Formación de Placa

Tabla 10. Infectabilidad de los distintos stocks víricos obtenidos

Stock viral	MOI	PFU/ml	Total PFU	Volumen
primario	0,01	10^7	10^7	1 ml
1 pase	0,02	5×10^7	5×10^7	1 ml
2 pase	5	$2,5 \times 10^8$	$2,5 \times 10^9$	10 ml
3 pase	25	$1,7 \times 10^8$	$1,5 \times 10^{10}$	90 ml
4 pase	50	$1,7 \times 10^8$	1×10^{11}	600 ml

2.14 Cálculo de título de partículas virales mediante el método: dosis de infección del cultivo (DIC50)

Con diluciones seriadas del virus se infectaron células 293A en una placa de Petri de 96 pocillos (Figura 25). Tras incubar las células con las diluciones virales a 37°C durante 10 días se procedió a la lectura de las placas utilizando un microscopio invertido. Se observó el efecto citopático en cada uno de los pocillos. Se contó el efecto citopático (CPE) por fila.

La fila control no presentó CPE. La fila con la menor dilución viral presento un CPE del 100% (10/10) mientras la fila con la mayor dilución viral presentó un CPE del 0% (0/10).

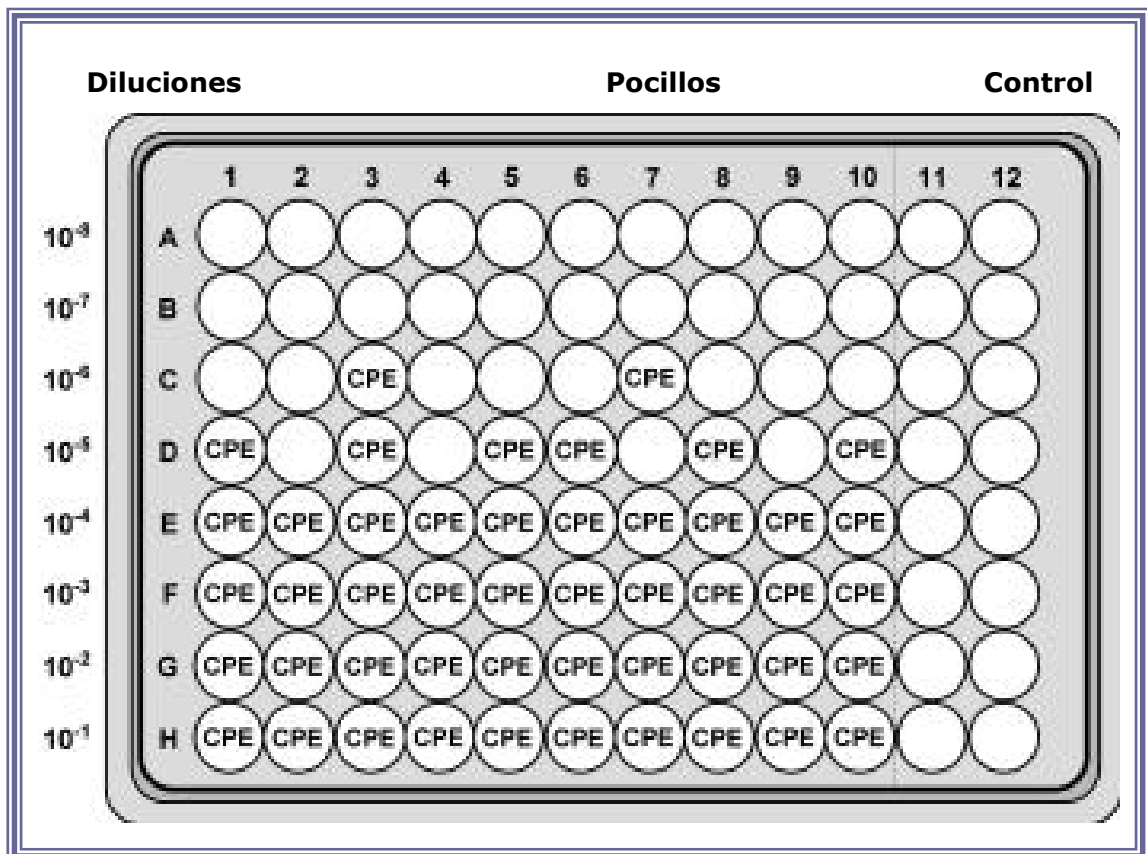


Figura 25. Representación de placa de petri con 96 pocillos en los que se plantaron células 293A y se procedió a determinar la infectabilidad de diluciones seriadas del adenovirus recombinante. Los pocillos marcados con CPE representan aquellos con un efecto citopático total. Cada una de las diluciones virales se probó en 10 pocillos. Las filas 11 y 12 son el control donde no se añadió dilución viral.

En la Figura 25, se representa la placa de 96 pocillos y en los pocillos donde se observó la muerte celular completa se ha marcado con CPE, los que no están marcados representan a los pocillos en los que las células no fueron infectadas por la dilución viral.

En la Tabla 11 se suman los resultados obtenidos en la placa de 96 pocillos. Se presenta la razón de pocillos positivos para cada dilución viral. Así, por ejemplo para la menor dilución viral (10^{-1}) 10 pocillos de 10 fueron positivos presentando una razón de 1.

Tabla 11. Representación de la dilución viral frente al número de pocillos positivos.

Dilución viral	Razón pocillos positivos por fila
10^{-1}	10/10=1
10^{-2}	10/10=1
10^{-3}	10/10=1
10^{-4}	10/10=1
10^{-5}	6/10=0,6
10^{-6}	2/10=0,2
10^{-7}	0/10=0
10^{-8}	0/10=0

Determinación del título viral

Mediante el método de KÄRBER se determinó el título viral. El título viral se define como el número de Unidades de Formación de Placa

(UFP) por ml. Para cada una de las diluciones virales se determino su título viral.

Para 100 μ l de dilución el título fue:

$$T = 10^{1+d(S+0,5) - 0,7}$$

Donde el valor de d corresponde al log neperiano de la dilución viral.

$$d = \text{Log}^{10} \text{ de la dilución}$$

El valor de S corresponde a la suma de los coscientes de pocillos positivos, ver Tabla 11,

S= la suma de los coscientes positivos

$$S = 1+1+1+1+0,6+0,2 = 4,8$$

Por lo que el valor del título fue:

$$T = 10^{1+1(4,8+0,5) - 0,7}$$

$$T = 10^{7,3 - 0,7}$$

$$T = 10^{6,6}$$

O lo que es lo mismo

$$T = 10^{6,6} \text{ UFP / ml} = 4 \times 10^6 \text{ PFU / ml}$$

2.15. Infección de las células con el adenovirus

Para la infección de las células granulares de cerebelo de rata con el adenovirus recombinante que contenía la subunidad quimérica

alfa1CD se utilizó el stock viral nº 4, de la amplificación del virus se tiene un título viral de $1,7 \times 10^8$ PFU / ml.

Tras la infección, las células fueron marcadas con fragmentos Fab' del anticuerpo específico bd24 y fueron visualizadas por medio de un anticuerpo secundario conjugado con isotiocinato de fluorescina (FITC) que tras excitación con el microscopio de fluorescencia emite en el canal del verde.

En la Figura 26, panel A se aprecia una fotografía en contraste de fase de estas células neuronales transfectadas. Se observa claramente la morfología típica de este tipo celular con el soma del que parten las dendritas y el axon. En el panel B se muestran las mismas células visualizadas por medio del microscopio de fluorescencia. Se ve claramente como la subunidad a1CD transfectada se expresa en la membrana quedando atrapada en el soma celular, no se observa tinción fluorescente en ninguna de las prolongaciones celulares. Parece pues que existe algún tipo de mecanismo que impide el paso de los receptores de GABA que contienen la subunidad a1CD hacia las dendritas y el axón.

El anticuerpo bd24 es específico contra la subunidad alfa1 de bovino y de humano por lo que no reconoce las subunidades de alfa1 de rata. Al construir las subunidades quiméricas de alfa1 se tuvo en cuenta este hecho y se introdujo tanto en a1CH como en a1CD el epítopo que reconoce el anticuerpo bd24. De esta forma al marcar a las células granulares obtenidas de cerebelo de rata con el anticuerpo bd24, este va a reconocer y se va a unir únicamente a las subunidades a1 quiméricas transfectadas y no a las subunidades alfa1 nativas que

puedan expresar estas neuronas de rata. Por lo tanto los complejos que se visualizan en la Figura 26 son receptores de GABA que contienen la subunidad quimérica $\alpha 1CD$ transfectada. Y es esta subunidad la que se observa localizada exclusivamente en el soma celular.

En la Figura 26-A se distinguen fácilmente otros tipos celulares, su tamaño es mayor que las neuronas y su forma de huso muy diferente a las células granulares. Al comparar ambas fotografías se aprecia como estas células, no neuronales, no presentan la subunidad $\alpha 1CD$ en su membrana, estas células han sido infectadas con el adenovirus pero solo con la subunidad $\alpha 1CD$. Estudios previos (Peran y cols., 2001), concluyen que la subunidad $\alpha 1$ no es capaz, por si sola, de abandonar el retículo endoplasmático, necesita ensamblarse con la subunidad beta para alcanzar una localización en la membrana celular. Por lo tanto, sólo los complejos del receptor GABA que contengan al menos una subunidad beta por cada $\alpha 1$ son expresados en la membrana. Las células no neuronales no expresan las otras subunidades del RGABA, por lo que la subunidad $\alpha 1CD$ al ser expresada queda localizada intracelularmente y en una tinción in vivo (Figura 26-B) los anticuerpos no pueden alcanzarla y no presenta marcaje. En cambio las células neuronales expresan las otras subunidades del RGABA, por lo que el marcaje fluorescente de la Figura 26-B, es una prueba concluyente de que la subunidad $\alpha 1CD$ al ser incorporada en el genoma neuronal, tras la transfección, se ha ensamblado con éxito a las subunidades GABA nativas.

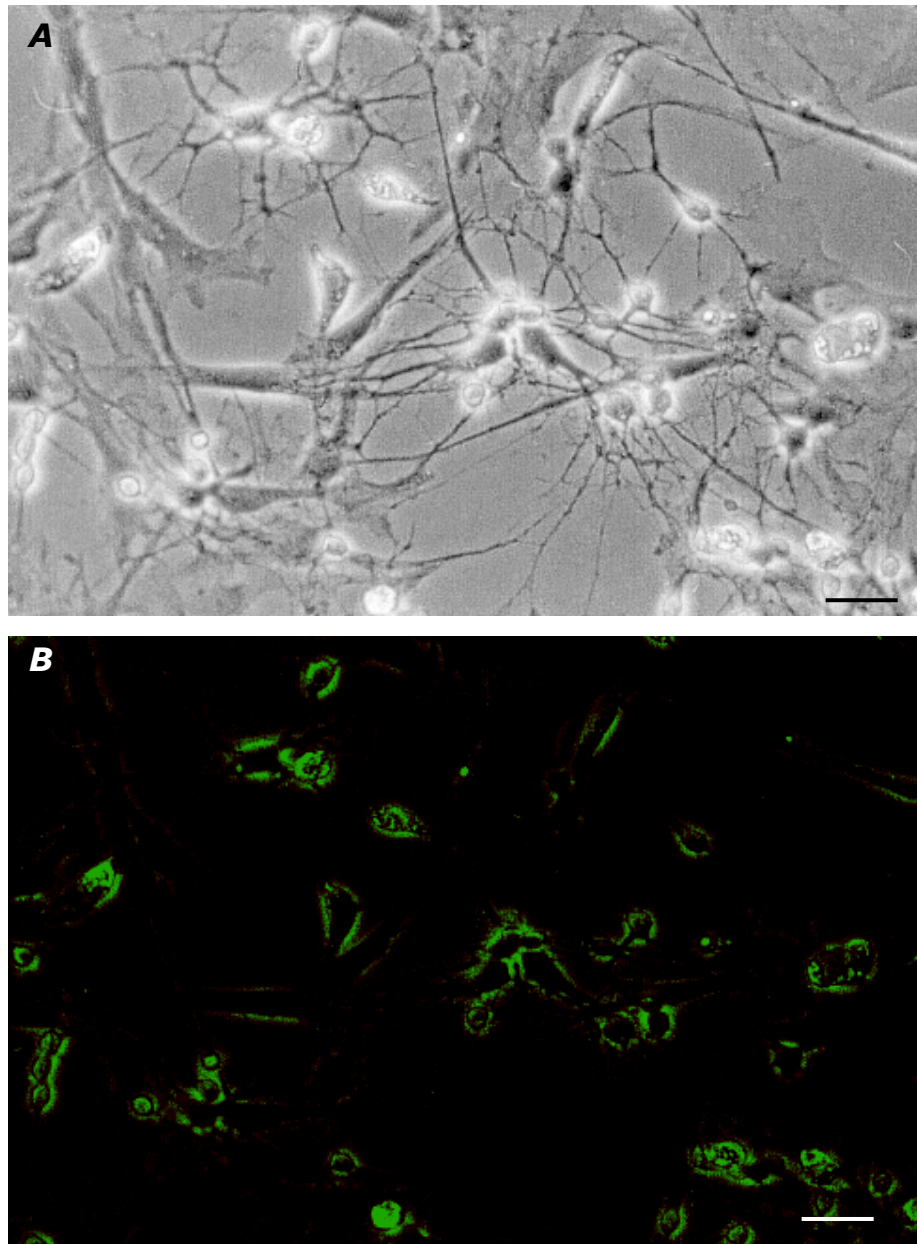


Figura 26. *Celulas granulares de cerebelo de rata transfectadas mediante adenovirus recombinante con la subunidad quimerica alfa1CD. Panel A fotografía de las células en contraste de fase. Panel B las células del panel A marcadas con el anticuerpo bd24 y visualizadas mediante fluorescencia. Barra de escala 40 μ m.*

Tras la infección de las células granulares de cerebelo de rata con el adenovirus recombinante que contenía la subunidad quimérica de alfa1, $\alpha 1CH$, se realizó un marcaje mediante inmunocitoquímica.

En la Figura 27 se observa la distribución de la fluorescencia por toda la superficie celular incluyendo dendritas y axón. Se concluye, por lo tanto, que los receptores de GABA que contenían dicha subunidad presentan una distribución que abarca la membrana neuronal en su totalidad.

Este hecho contrastó con lo observado para aquellos receptores que contenían la subunidad $\alpha 1CD$ (ver Figura 26) cuya localización se limitó al soma celular.

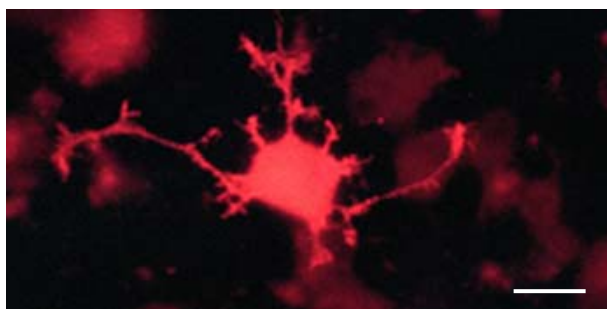


Figura 27. *Celula granular de cerebelo de rata transfectada mediante adenovirus recombinante con la subunidad quimérica alfa1CH, marcada con el anticuerpo bd24 y visualizadas mediante fluorescencia. Barra de escala 10 μm .*

3. ESTUDIOS DE SINGLE PARTICLE TRACKING (SPT) EN CÉLULAS COS7

La técnica de seguimiento individual de partículas (SPT) se empleó para estudiar la dinámica de membrana de receptores recombinantes expresados en la línea celular COS7.

En primer lugar a fluoro-esferas de 50-100 nm se les unió covalentemente los anticuerpos específicos para las sub-unidades alfa1 y beta3 del receptor de GABA.

Se utilizaron fragmentos Fab' de dichos anticuerpos (del anticuerpo bd24 para alfa1 y del anticuerpo bd17 para beta3), para evitar posibles problemas de "crosslinking" entre los anticuerpos, que pudieran falsear los resultados.

Se denominaron a estas fluoro-esferas a1-FS para alfa1 y b3-FS para beta3.

Las fluoro-esferas unidas a los fragmentos Fab de los anticuerpos mencionados, fueron utilizadas para seguir el movimiento de un único complejo de receptor recombinante sobre la superficie de la célula en tiempo real.

3.1. Estudios de SPT de complejos compuestos únicamente por la subunidad beta3.

Las células COS7 fueron transfectadas con la sub-unidad beta3 de los receptores de GABA. 24 horas tras la transfección se marcaron las células con las fluoro-esferas b3-FS. De esta forma se marcaba cada receptor expresado, y compuestos únicamente por la sub-unidad beta3.

En la Figura 28 se muestran los resultados de las medidas de SPT realizadas en células COS7 transfectadas con la subunidad beta3. Se muestra la trayectoria de 4 receptores beta3 homoméricos, cada uno de los cuales experimenta una trayectoria independiente. Cada trayectoria viene reflejada en la figura por un color diferente. El origen de las trayectorias es un punto aleatorio. Las trayectorias de SPT medidas por los complejos de beta3 fueron características de un movimiento no restringido, cada uno de los fluoro-esferas seguidas experimentó un desplazamiento que se podría definir como libre sobre la superficie celular. Estas trayectorias responden a un tipo de movimiento browniano, es decir aparentemente no dirigido. Algunos complejos llegaron incluso a mostrar movimientos de largo alcance sobre la superficie de la célula. Que en algún caso excedieron los 2 milímetros, siempre teniendo en cuenta la escala temporal del experimento que fue de 16 segundos.

Las líneas coloreadas de la Figura 28 muestran las trayectorias seguidas por diferentes complejos.

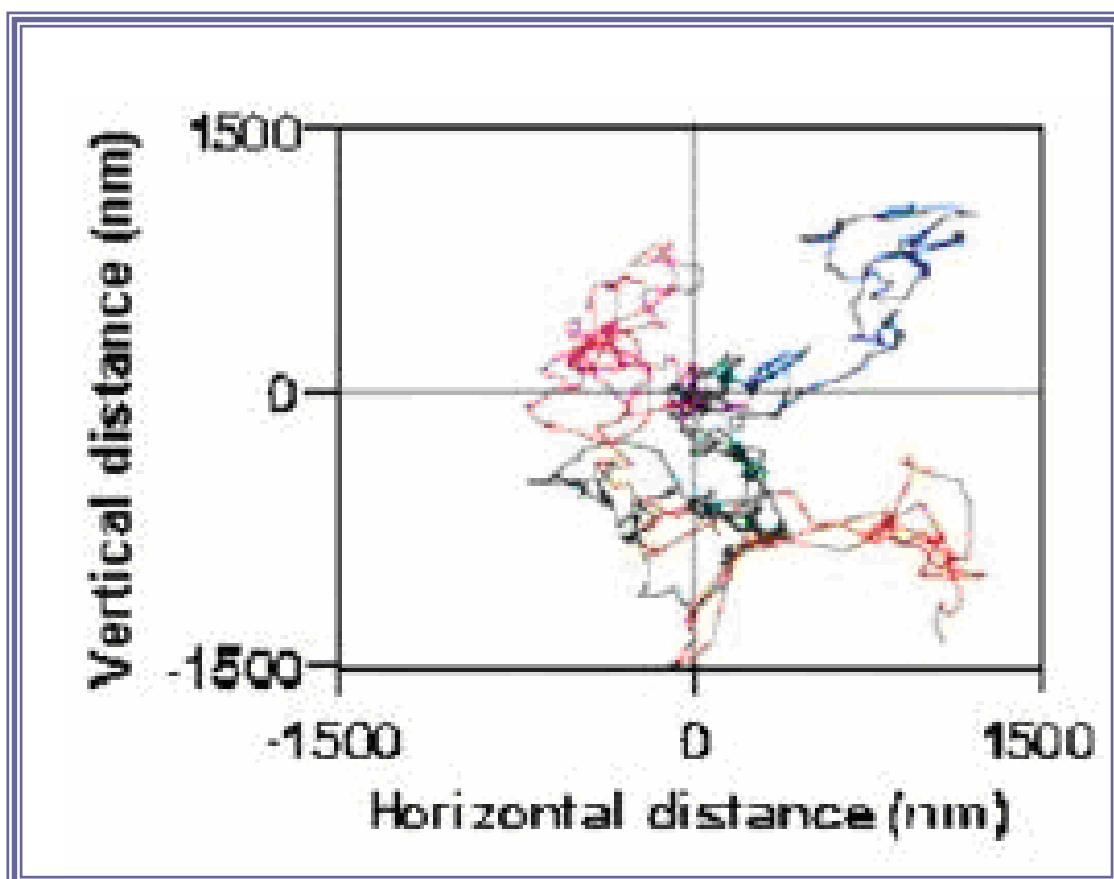


Figura 28. Resultados de SPT mostrando la trayectoria de complejos beta3 homoméricos expresados en células COS7.

Se muestra la trayectoria seguida por cuatro esferas fluorescentes a las que se unió la fracción Fab' del anticuerpo contra la sub-unidad beta3 (b3-FS). Cada color representa un complejo beta3 diferente. El origen de las trayectorias comienza en un punto arbitrario.

En la Figura 29 se muestra la media del cuadrado del desplazamiento (MSD) de 10 complejos fluorescentes unidos a la subunidad beta 3.

En un experimento de SPT la trayectoria de una partícula dada se mide por pares de puntos, para unificar el resultado y reducir el ruido experimental, se calcula el cuadrado de la media de la suma de cada par de puntos que componen la trayectoria. Obteniéndose así el valor de la media del cuadrado del desplazamiento (MSD). La MSD para un intervalo de tiempo dado se define pues, como la media de todos los pares de puntos independientes que componen la trayectoria en ese intervalo de tiempo, todos los pares de puntos que se registran en el tiempo dado (Qian y cols., 1991).

La línea negra gruesa recta representa el valor teórico para la difusión libre y los puntos trazados en rojo son el promedio de todas las MSD medidas para los 10 experimentos. Esta línea representa la fracción móvil de los complejos formados por la subunidad beta3.

Este valor es inicialmente coincidente con su valor teórico y permanece tras esto dentro del valor estimado por la desviación estadística, incluso en los intervalos grandes de tiempo.

Este dato sugiere que la mayoría de los complejos homoméricos de la subunidad beta 3 pueden difundir libremente.

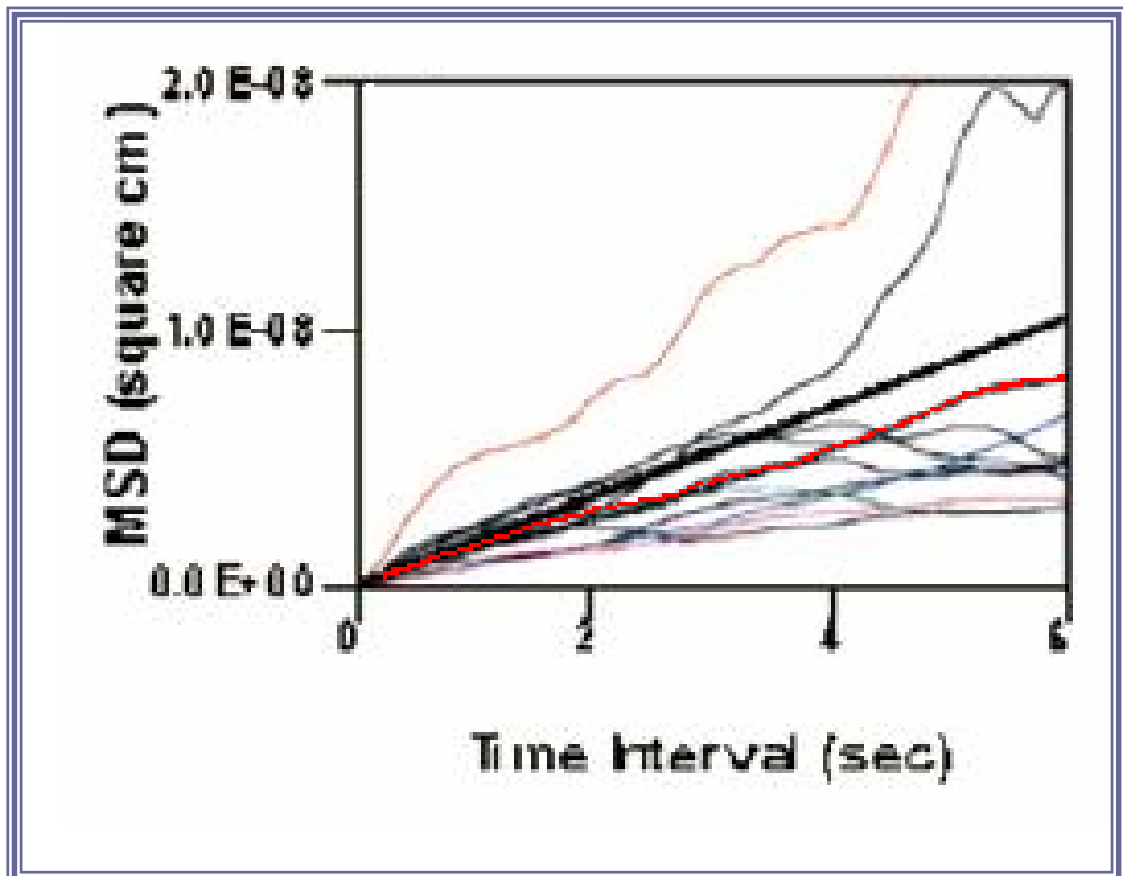


Figura 29. Resultados de SPT mostrando la media del cuadrado del desplazamiento (MSD) de 10 complejos beta3 homoméricos expresados en células COS7. Las líneas representan la porción inicial del desplazamiento de los distintos complejos (b3-FS) medidos como media cuadrada del desplazamiento (MSD) en un intervalo de 6 segundos.

El histograma de la Figura 30 muestra los valores del Coeficiente de Difusión estimados para cada complejo marcado con las fluoro-esferas b3-FS. Este coeficiente de difusión fue estimado a partir de la segunda mitad del movimiento inicial.

La mayoría de los complejos mostraron una movilidad alta. El 66% de los complejos se movían rápidamente con coeficientes de difusión de $4,39 \pm 0,66 \times 10^{-10} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ y una media de desplazamiento de $1,4 \mu\text{m}$. El tercio de complejos restante, mostró una difusión más lenta, pudiendo aparecer en experimentos de recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueo (FPR) como una fracción "inmóvil".

Sin embargo, las medidas de SPT demuestran que hay movimiento dentro de esta región. Los datos de SPT sugieren que los complejos homoméricos de beta3 "no están atados" y pueden difundir libremente dentro de un dominio celular relativamente grande, ya que realizaron desplazamientos de más de $1,4 \mu\text{m}$.

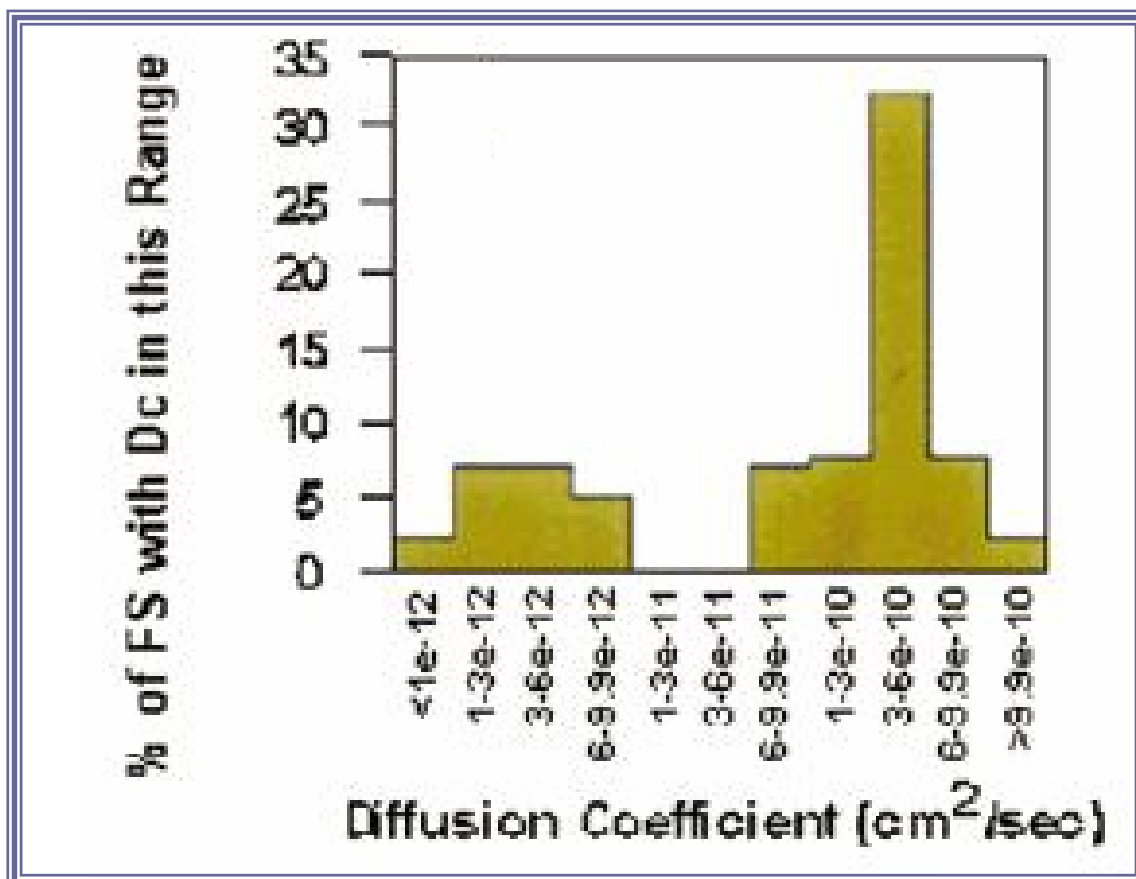


Figura 30. Resultados de SPT mostrando el Coeficiente de Difusión complejos beta3 homoméricos expresados en células COS7. Se muestra un histograma donde se expresa el rango de Dc para cada complejo b3-FS estimado a partir del medio segundo inicial del movimiento.

3.2. Estudios de SPT de complejos compuestos por la subunidad alfa1 y la subunidad beta3.

Las células COS7 fueron transfectadas con las subunidades alfa1 y beta3. Tras la transfección las células se marcaron con las esferas fluorescentes unidas covalentemente a los anticuerpos específicos para la subunidad alfa1 (a1-FS).

Cuando la subunidad alfa1 fue incluida en el complejo se produjeron cambios en el comportamiento de los mismos. Las medidas de SPT mostraron que los complejos formados por alfa1 y beta3 tenían movilidades diferentes a los que mostraban los complejos donde únicamente se había incluido la subunidad beta3. La dinámica de membrana experimentada por los complejos de receptor que incluía sólo la subunidad beta3, y que se había definido como parcialmente libre, viró hacia una dinámica estática experimentada por los complejos alfa1beta3.

En la Figura 31 se muestran los resultados de las medidas de SPT realizadas en células COS7 transfectadas con las subunidades alfa1 y beta3. Se muestra la trayectoria de 4 receptores alfa1beta3 heteroméricos, cada uno de los cuales experimentó una trayectoria independiente. En la figura 31, cada una de las trayectorias experimentadas por los complejos alfa1beta3, viene reflejada por un color diferente. La medida de las trayectorias se realizó comenzando en un punto aleatorio del recorrido de las mismas.

Se observa como las trayectorias de SPT medidas para los complejos de alfa1beta3 son características de un movimiento restringido.

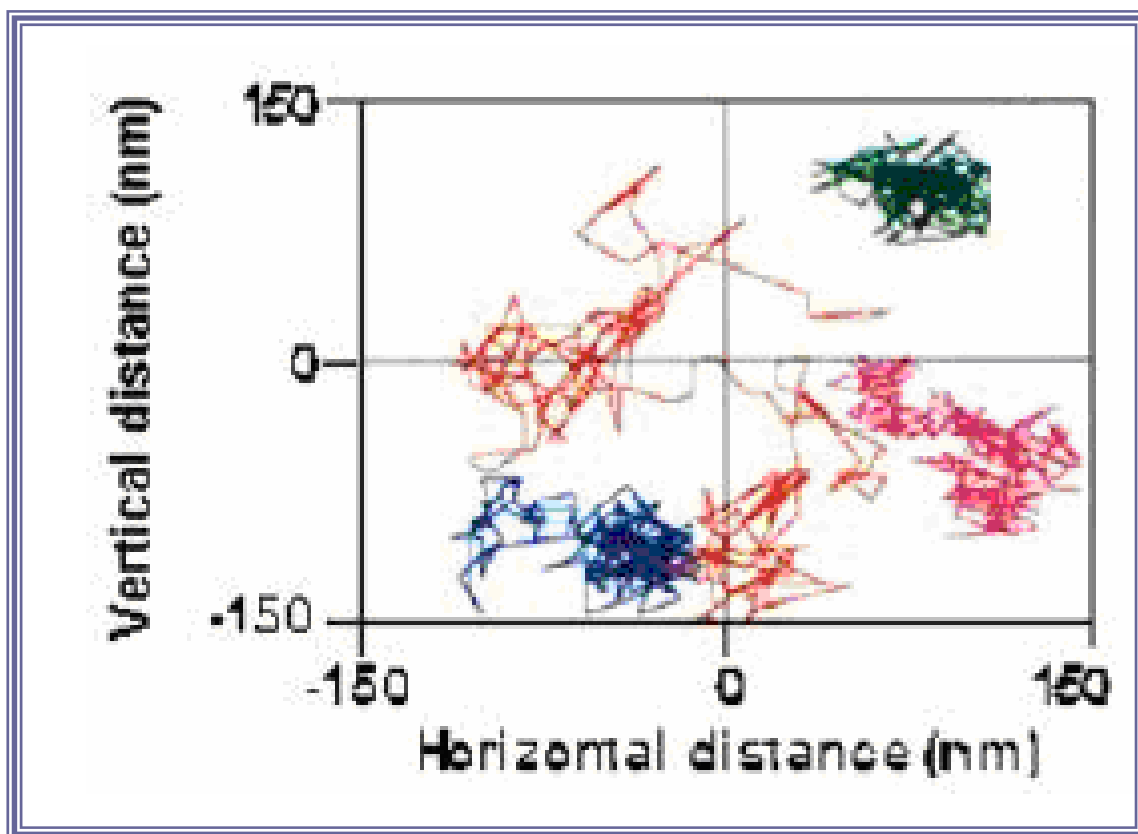


Figura 31. Resultados de SPT mostrando la trayectoria de complejos $\alpha 1\beta 3$ heteroméricos expresados en células COS7. Se muestra la trayectoria seguida por cuatro esferas fluorescentes a las que se unió la fracción Fab' del anticuerpos contra la sub-unidad $\alpha 1$ ($\alpha 1$ -FS). Cada color representa un complejo $\alpha 1\beta 3$ diferente. El origen de las trayectorias comienza en un punto arbitrario.

Como se ya se ha indicado anteriormente, cada una de las líneas coloreadas de la Figura 31 muestra la trayectoria seguidas por un complejo alfa1beta3 diferente. Se observa claramente como los complejos recombinantes alfa1beta3 expresados en las células COS7 experimentan una dinámica restringida. Las líneas de color describieron un dibujo de "ovillo de lana". Es decir, los complejos de a1b3 experimentaron un recorrido corto y limitado en el espacio. Este es el modelo típico de complejos sometidos a una restricción de su movilidad.

Es importante observar que la escala de los ejes de la Figura 31 es un orden de la magnitud menor que la de los ejes de la Figura 28. Esto demuestra que los complejos beta3 homoméricos experimentaron un recorrido mayor que los complejos heteroméricos alfa1beta3.

La media del cuadrado del desplazamiento (MSD) para los complejos recombinantes a1b3 expresados en células COS7 y marcados con a1-FS se muestra en la Figura 32.

Observe la diferencia en magnitud en la escala del eje de y entre Fig. 32 y 29.

Hay dos receptores que mostraron un comportamiento anómalo ya que describen unas líneas que se asemejan a la verticalidad y que escapa de un modelo de difusión simple en la membrana. Estas mediadas se estimaron por tanto como errores del método ya que no describen un tipo de dinámica razonable para este tipo de complejos sino que serían el resultado de un transporte mediado. Los ocho receptores restantes a los que se siguió individualmente su trayectoria se mantuvieron por debajo, tendiendo a la horizontalidad, de la línea gruesa que determina la difusión libre por lo que se concluyó que su movilidad era restringida.

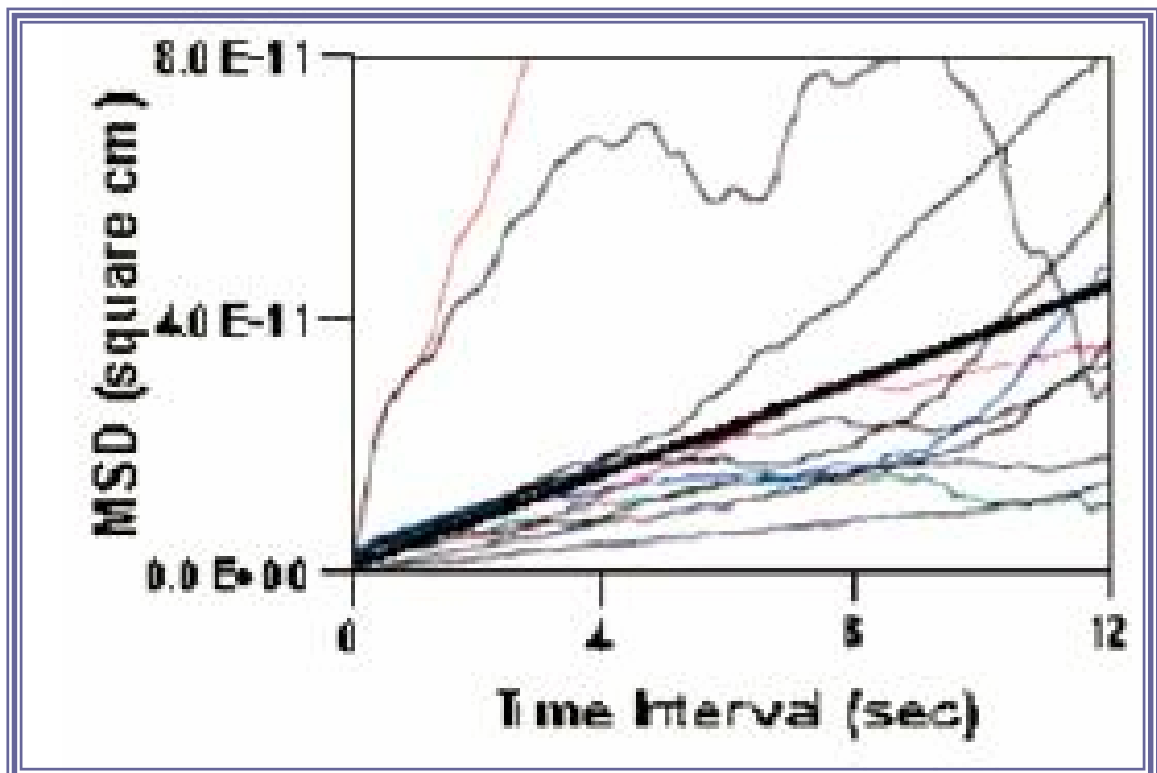


Figura 32. Resultados de SPT mostrando la media del cuadrado del desplazamiento (MSD) de 10 complejos alfa1beta3 heteroméricos expresados en células COS7. Las líneas representan la porción inicial del desplazamiento de los distintos complejos alfa1beta3 marcadas con las fluoro-esferas a1-FS, medidos como media cuadrada del desplazamiento (MSD) en un intervalo de 12 segundos.

En la Figura 33 se muestran los resultados de las medidas de SPT realizadas en células COS7 transfectadas con la subunidades alfa1 y beta 3. Los coeficientes de difusión para cada a1-FS se estimaron a partir de la mitad inicial del primer segundo de movimiento.

En la figura se puede observar como aproximadamente el 90% de los complejos alfa1beta3 eran inmóviles, con una media de Difusión de $D_c = 2,68 \pm 0,28 \times 10^{-10} \text{ cm}^2\text{sec}^{-1}$ y con una media de desplazamiento de 50 nm o incluso menor.

Si se comparan los histogramas de D_c para complejos de beta3 (Figura 30) y complejos de alfa1beta3 (Figura 33), se observa claramente la diferencia en la dinámica de ambos receptores recombinantes.

Estos datos sugieren que los complejos heteroméricos a1b3 experimentaban restricciones en su libre difusión. Este confinamiento podría ser debido a interacciones directas con elementos del citosqueleto o a la inclusión de dichos complejos en corrales. Al quedar atrapado el complejo alfa1beta3 dentro de un dominio inmóvil de la membrana experimentará en un intervalo de tiempo muy corto una difusión lateral que lo llevará hasta "chocar" contra la barrera del dominio. Al encontrar esta restricción en su movilidad el coeficiente de difusión disminuirá en función del tiempo, como se observa en la Figura 31.

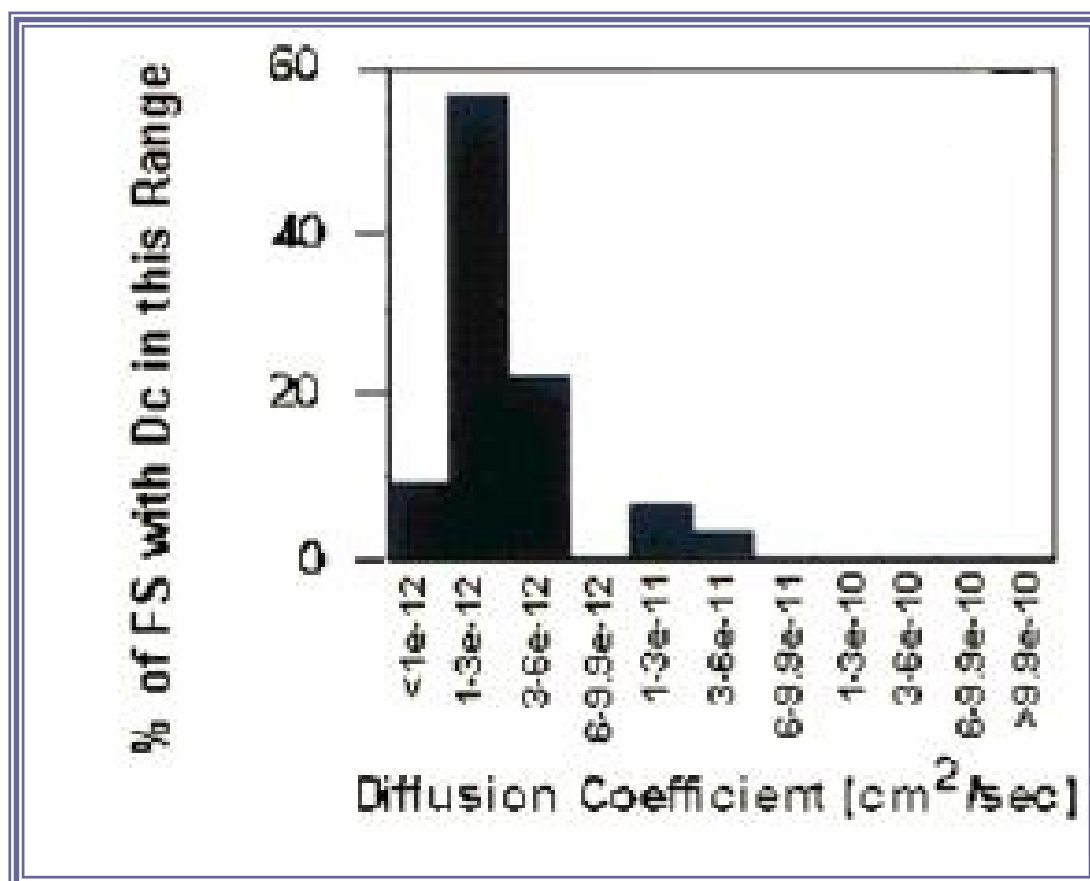


Figura 33. Resultados de SPT mostrando el Coeficiente de Difusión de complejos $\alpha 1\beta 3$ heteroméricos expresados en células COS7. Se muestra un histograma donde se expresa el rango de Dc para cada complejo $\alpha 1$ -FS estimado a partir del medio segundo inicial del movimiento.

4. ESTUDIOS DE SINGLE PARTICLE TRACKING (SPT) EN NEURONAS

La técnica de seguimiento individual de partículas (SPT) se empleó para estudiar la dinámica de membrana de receptores recombinantes expresados en las células granulares de cerebelo de rata.

Se utilizaron los mismos marcadores que los empleados para el estudio de la dinámica de membrana en receptores expresados en células COS7. Estos fueron los fragmentos Fab' del anticuerpo específico para la subunidad alfa1 (bd24).

Se infectaron a las células granulares de cerebelo de rata por medio del adenovirus recombinante cuya construcción se ha detallado en material y métodos. Por medio del vector viral se introdujo en estas neuronas el gen responsable para expresar las subunidades de alfa1 quimeras $\alpha 1CD$ (carente de lazo citoplasmático M3/M4) y $\alpha 1CH$ (con lazo M3/M4). Estas unidades se ensamblaron exitosamente con subunidades endógenas del receptor GABA de las células granulares ya que tras su marcaje fueron visibles sobre la membrana celular (Figura 26). Se ha demostrado que al transfectar células únicamente con la subunidad alfa1 de los receptores GABA se forman complejos homoméricos incapaces de abandonar una localización intracelular, únicamente cuando una subunidad beta3 es introducida en el complejo la subunidad alfa1 se expresa en la membrana celular (Perán y cols., 2001; Perán y cols., 2004). Por lo tanto y redundando en lo dicho anteriormente, el visualizar los receptores marcados con el anticuerpo bd24 probó que las subunidades transfectadas se acoplaban con subunidades endógenas para formar receptores GABA que se localizaban en la membrana celular.

4.1. Estudios de SPT al transfectar las células granulares de cerebelo de rata con la subunidad quimera de alfa1CH

Las células granulares de cerebelo de rata fueron transfectadas con la sub-unidad alfa1CH del receptor GABA. 24 horas tras la transfección se marcaron las células con las fluoro-esferas a1-FS. Como se ha mencionado anteriormente y se detalla en material y metodos las a1-FS se construyeron mediante la unión del fragmento Fab del anticuerpo bd24 a las microesferas. El anticuerpo bd24 es específico y reconoce la subunidad alfa1 de bovino y de humano por lo que no reconoce las subunidades de alfa1 de rata. Al construir las subunidades quimericas de alfa1 se tuvo en cuenta este hecho y se introdujo tanto en a1CH como en a1CD el epitope que reconoce el anticuerpo bd24. De esta forma al marcar a las células granulares obtenidas de cerebelo de rata con las a1-FS estas esferas van a reconocer y se van a unir unicamente a las subunidades a1CH transfectadas y no a las subunidades alfa1 del receptor GABA nativas. Es decir los complejos a los que se siguió individualmente por medio de SPT eran receptores GABA que contenian subunidades endogenas de la célula neuronal junto, al menos, una subunidad alfa1 transfectada por medio de la infección por adenovirus.

En la Figura 34 se muestran los resultados de las medidas de SPT realizadas en células granulares de cerebelo de rata transfectadas con la subunidad alfa1CH del receptor GABA.

Se muestra la trayectoria de 5 receptores, cada uno de los cuales experimento una trayectoria independiente. Cada trayectoria viene reflejada en la figura por un color diferente. Cada una de las trayectorias tiene un origen diferente y este es un punto aleatorio.

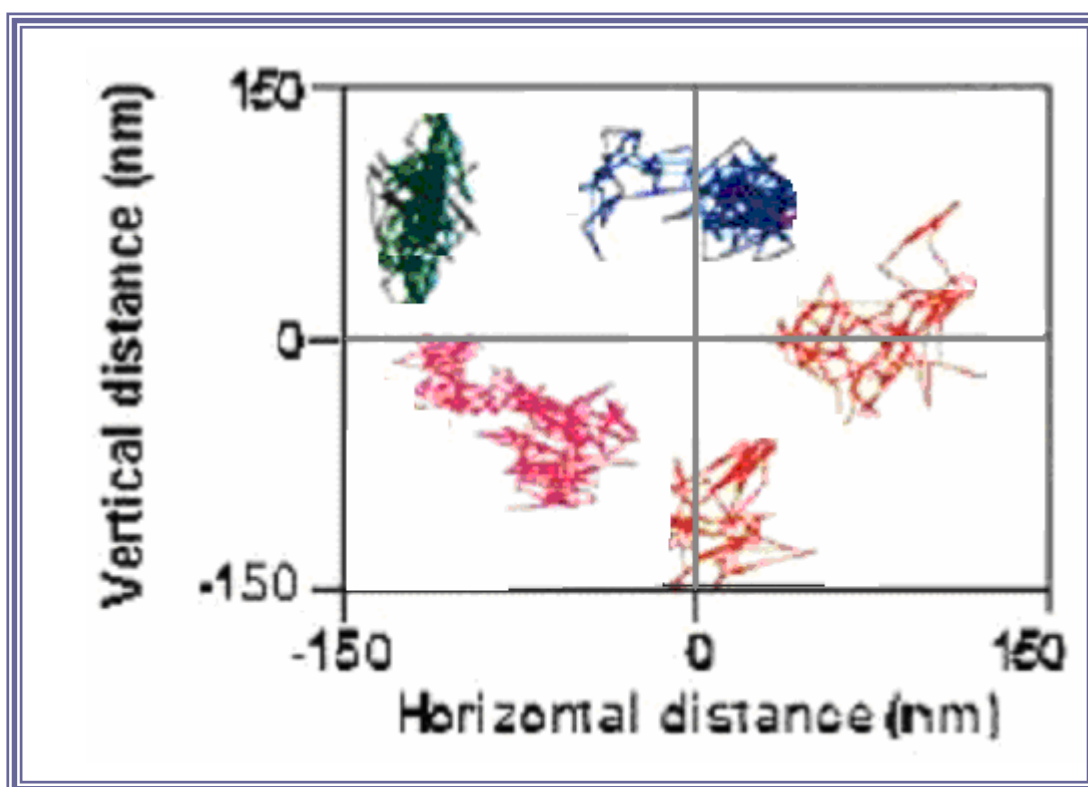


Figura 34. Resultados de SPT mostrando la trayectoria de receptores de GABA que contenían la subunidad quimérica de $\alpha 1CH$ expresados en neuronas. Se muestra la trayectoria seguida por cinco esferas fluorescentes a las que se unió la fracción Fab' del anticuerpo contra la sub-unidad $\alpha 1$ ($\alpha 1$ -FS). Cada color representa un complejo de receptor diferente. El origen de las trayectorias comienza en un punto arbitrario.

La trayectoria seguidas por los complejos que incluían a la subunidad quimérica $\alpha 1\text{CH}$ fueron claramente representativas de un movimiento restringido. Estos complejos quedaron atrapados en dominios celulares "corrales" que impidieron su libre difusión. Nuevamente encontramos un modelo de movimiento en el que los complejos forman un dibujo característico de "ovillo de lana". Se observa que los receptores marcados recorren distancias muy cortas, tanto longitudinalmente como verticalmente, llegando al extremo de los 50 nm.

En la Figura 35 se muestra la media del cuadrado de desplazamiento (MSD) de receptores de GABA que contenían la subunidad quimérica $\alpha 1\text{CH}$.

Cada una de las líneas representa el movimiento de un receptor individual y como se observa los desplazamientos fueron típicos de movimientos restringidos, los valores de MSD obtenidos se mantienen por debajo de la línea negra más gruesa que representa la libre difusión. Hay que señalar que cuanto más se acercan estas líneas, a la horizontalidad menor es el movimiento del complejo. La línea azul más gruesa, representa la media del valor de las 10 medidas de MSD, y indica claramente que la movilidad de dichos complejos fue restringida.

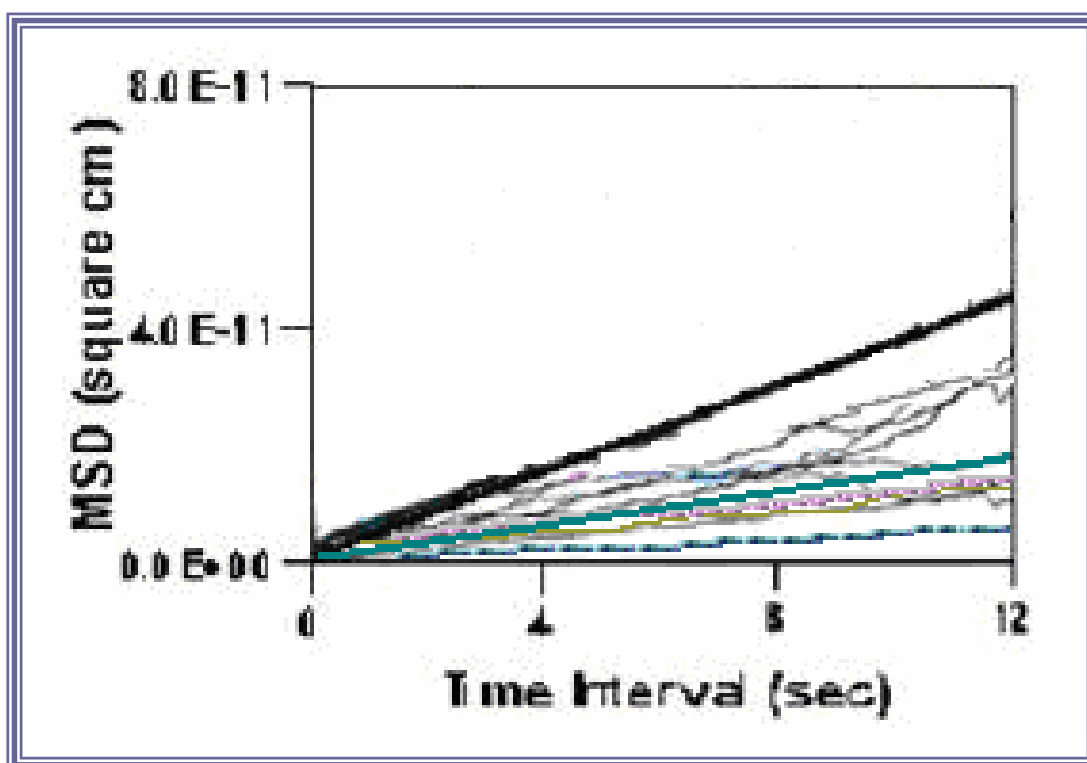


Figura 35. Resultados de SPT mostrando la media del cuadrado del desplazamiento (MSD) de 10 receptores de GABA que contenían la subunidad quimérica de alfa1CH expresados en neuronas Las líneas representan la porción inicial del desplazamiento de los distintos complejos marcadas con las fluoro-esferas $\alpha 1$ -FS, medidos como media cuadrada del desplazamiento (MSD) en un intervalo de 12 segundos.

Las medidas de SPT dan valores del coeficiente de difusión de los receptores marcados, estos resultados se suman en el histograma de la Figura 36. Se observa que los valores de la difusión de los receptores que contenían la subunidad quimérica $\alpha 1CH$ fueron muy bajos. Aproximadamente el 50% de dichos receptores alcanzaron valores del orden de $4,12 \pm 1,2 \times 10^{-10} \text{ cm}^2\text{sec}^{-1}$. Estos resultados son concordantes con los obtenidos mediante la técnica de recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueo (Perán y cols., 2004) y denotan que los complejos que contenían una subunidad $\alpha 1$ quimera, en la que se había conservado el lazo citoplasmático experimentaban una movilidad lateral muy restringida sobre la membrana plasmática.

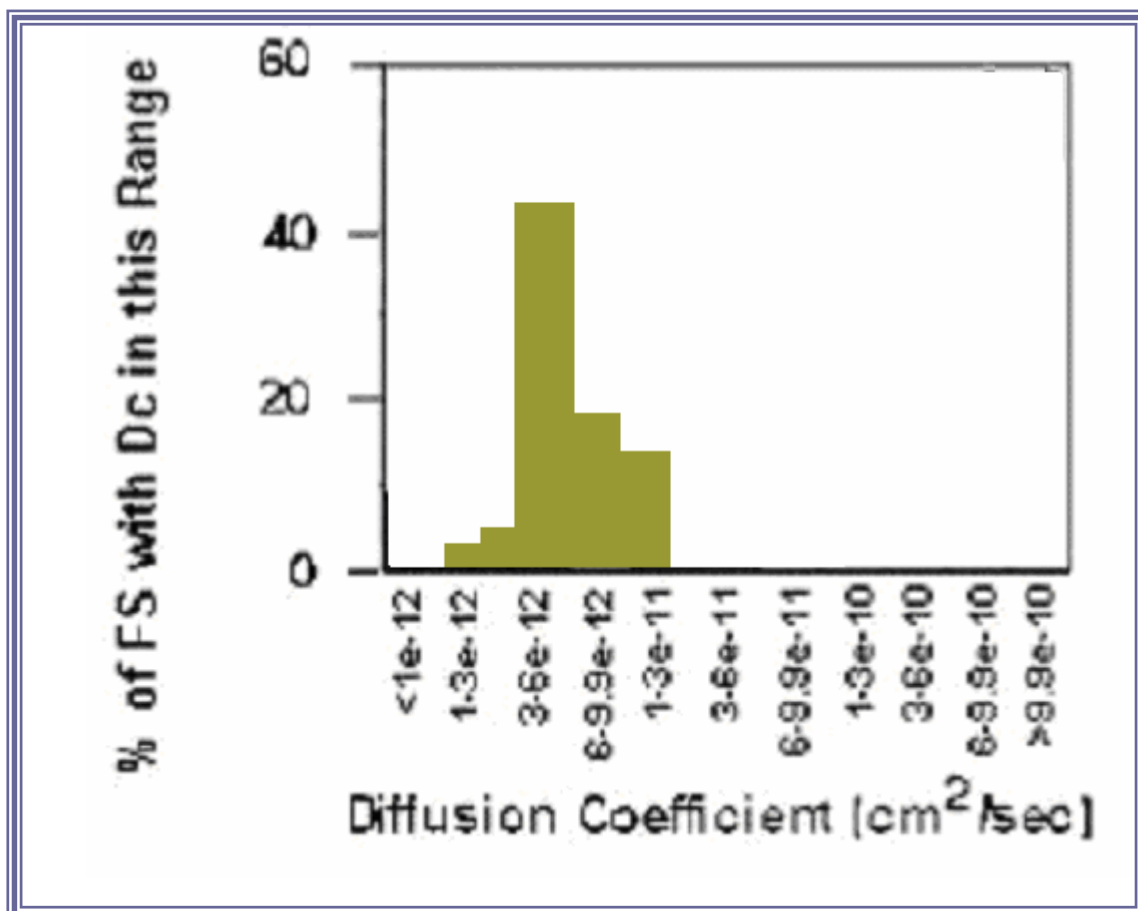


Figura 36. Resultados de SPT mostrando el Coeficiente de Difusión de receptores de GABA que contenían la subunidad quimérica de alfa1CH expresados en neuronas. Se muestra un histograma donde se expresa el rango de Dc para cada complejo α 1-FS estimado a partir del medio segundo inicial del movimiento.

4.2. Estudios de SPT al transfectar las células granulares de cerebelo de rata con la subunidad quimera de alfa1CD

La subunidad quimerica alfa1CD se construyó con el objeto de determinar el papel de la región M3/M4 de dicha subunidad, para lo cual este lazo citoplasmático se escindió dando lugar a la subunidad truncada a1CD.

Los experimentos de SPT realizados con células granulares de cerebelo de rata transfectadas con la subunidad a1CD mostraron un cambio sustancial en el patrón de movimiento de los receptores que contenían dicha subunidad en relación con lo observado para la quimera a1CH.

En la Figura 37 se muestran los resultados de las medidas de SPT realizadas en células granulares de cerebelo de rata transfectadas con la subunidad alfa1CD del receptor GABA.

Se siguieron cuatro receptores independientes, los cuales experimentaron trayectorias diferentes que se representan en la figura por medio de colores distintos. Los orígenes de cada uno de las trayectorias fueron tomados en puntos aleatorios.

Como se observa en la figura los complejos que incluían la subunidad a1CD experimentaron un movimiento sin restricciones sobre la superficie celular. Las fluoro-esferas a las que se siguió su desplazamiento se movieron libremente sobre la membrana, marcando un camino al azar o del tipo browniano aparentemente no dirigido. La trayectoria recorrida por alguno de los complejos llegó a alcanzar incluso los 2,5 milímetros, durante los 16 segundos que duró el experimento.

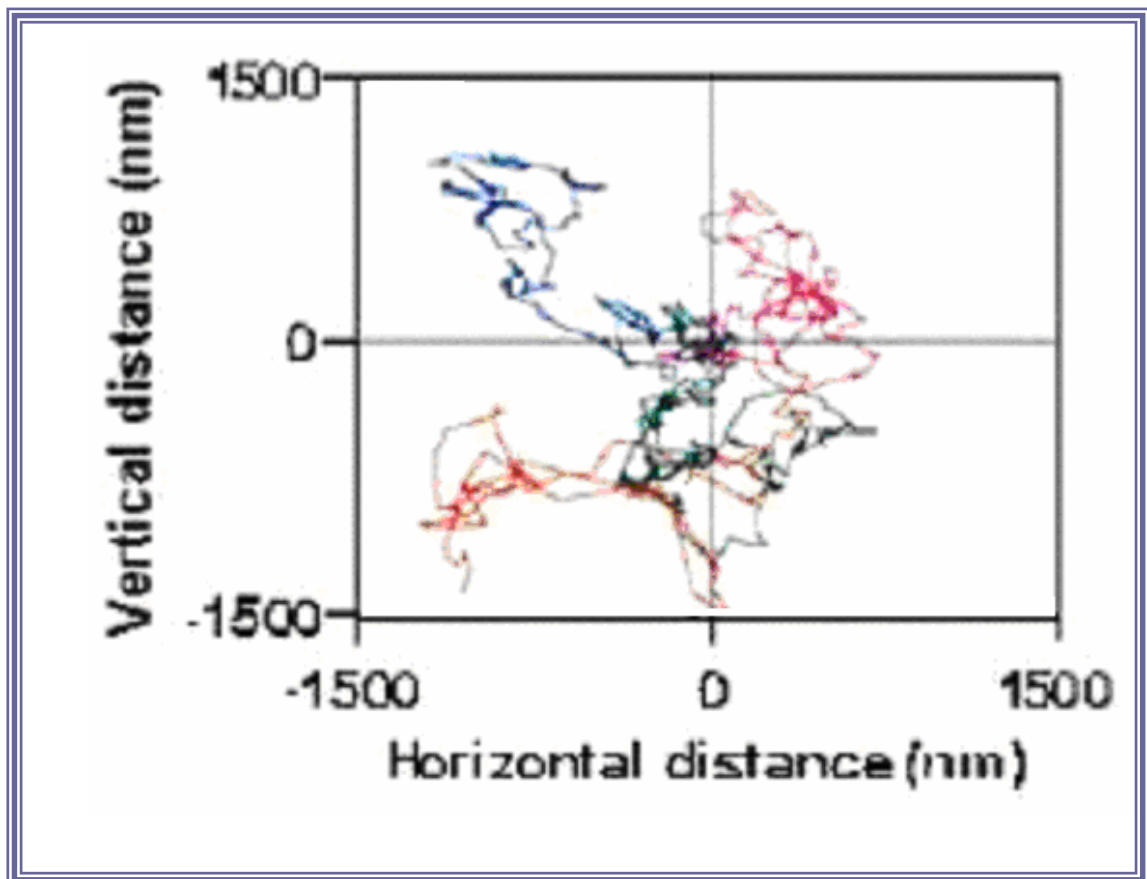


Figura 37. Resultados de SPT mostrando la trayectoria de receptores de GABA que contenían la subunidad quimérica de $\alpha 1CD$ expresados en neuronas. Se muestra la trayectoria seguida por cuatro esferas fluorescentes a las que se unió la fracción Fab' del anticuerpo contra la sub-unidad $\alpha 1$ ($\alpha 1$ -FS). Cada color representa un complejo de receptor diferente. El origen de las trayectorias comienza en un punto arbitrario.

En la Figura 38 se muestra la media del cuadrado del desplazamiento (MSD) de 10 complejos fluorescentes unidos a la subunidad alfa1 quimera a1CD.

Como ya se ha señalado este valor de la MSD es la suma de cada par de puntos que componen la trayectoria que describe el elemento marcado. La MSD para un intervalo de tiempo dado se define pues como la media de todos los pares de puntos independientes que componen la trayectoria en ese intervalo de tiempo, todos los pares de puntos que se registran en el tiempo dado (Qian y cols., 1991).

La línea gruesa negra representa el valor teórico para la difusión libre los puntos trazados rojos son el promedio para la fracción muy móvil de los receptores que contenían la subunidad a1CD. Se observa como esta línea roja transcurre casi solapándose con la línea del valor teórico de difusión libre con lo que se puede concluir que los receptores que contenían las subunidad a1CD, carente del lazo citoplasmático, escapan de la restricción impuesta a los receptores que contenían una subunidad alfa1 con esta región M3/M4 intacta (Figura 35).

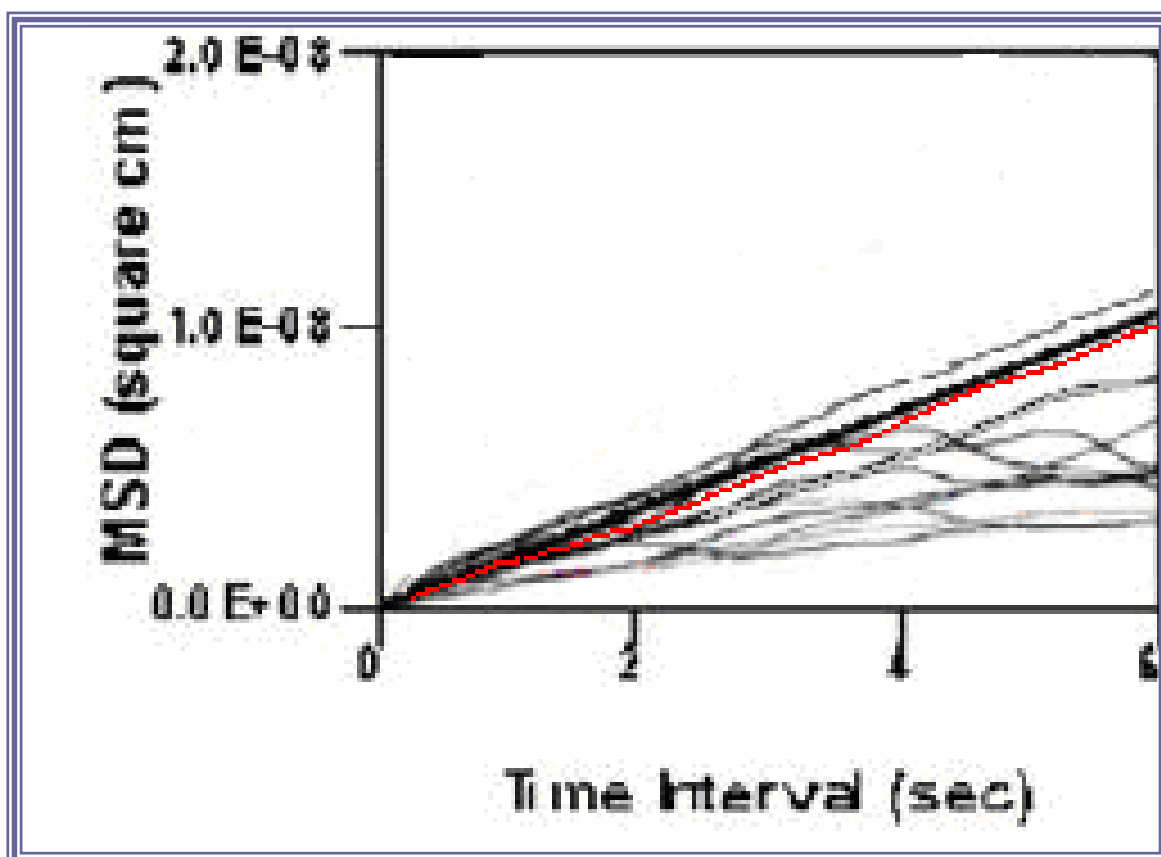


Figura 38. Resultados de SPT mostrando la media del cuadrado del desplazamiento (MSD) de 10 receptores de GABA que contenían la subunidad quimérica de alfa1CD expresados en neuronas Las líneas representan la porción inicial del desplazamiento de los distintos complejos marcadas con las fluoro-esferas $\alpha 1$ -FS, medidos como media cuadrada del desplazamiento (MSD) en un intervalo de 12 segundos.

El histograma de la Figura 39 muestra los valores del Coeficiente de Difusión estimados para cada complejo marcado con las fluoro-esferas a1-FS. Este coeficiente de difusión fue estimado a partir de la segunda mitad del movimiento inicial.

La mayoría de los complejos mostraron una movilidad alta. El 73% de los complejos se movían rápidamente con coeficientes de difusión de $5,19 \pm 0,12 \times 10^{-10} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ y una media de desplazamiento de 1,5 μm . Las medidas de SPT demuestran que hay movimiento dentro de esta región.

Como se observa en la Figura 26-B, los complejos que contienen la subunidad a1CD quedan atrapados dentro del soma celular, los resultados de SPT sugieren, no obstante, que dichos complejos se mueven libremente. Debe existir por lo tanto una barrera que impida que los receptores abandonen el soma celular y que difundan libremente por la totalidad de la superficie celular. Es decir, los complejos a1b3 presentan un movimiento libre del tipo browniano, pero su difusión está limitada al soma celular.

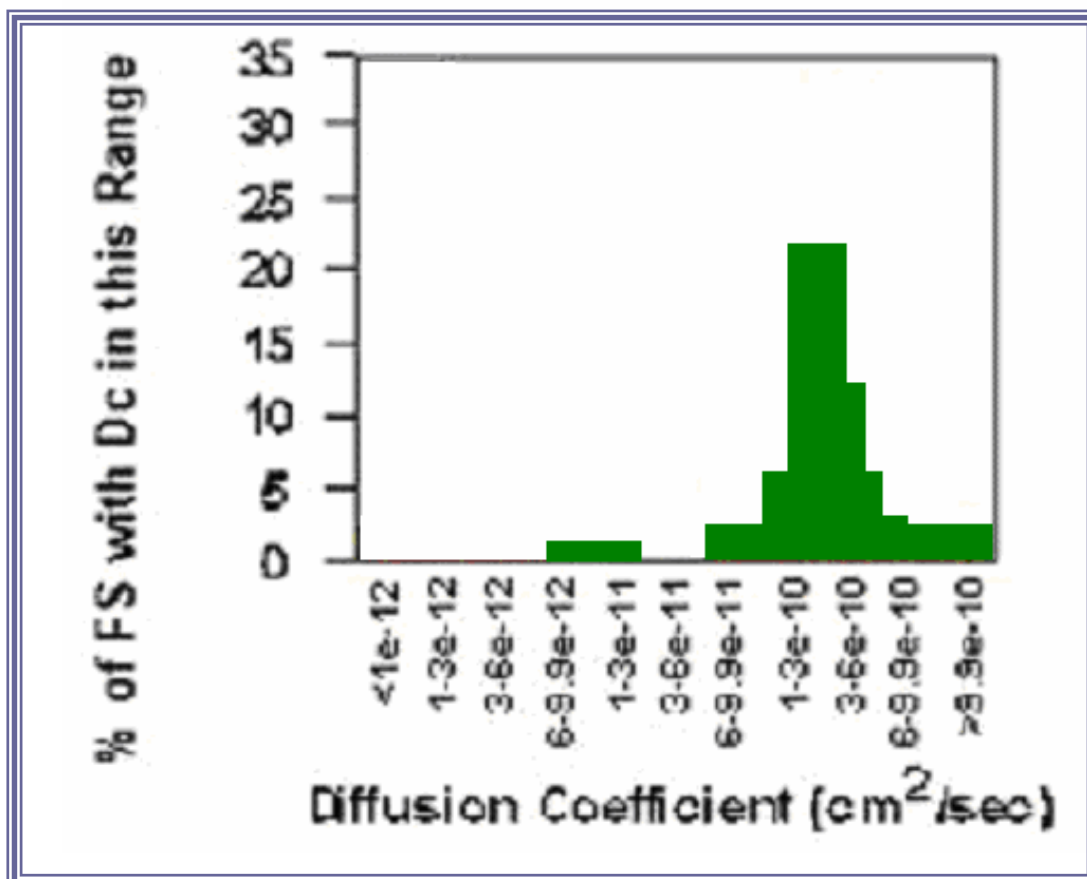


Figura 39. Resultados de SPT mostrando el Coeficiente de Difusión de receptores de GABA que contenían la subunidad quimérica de alfa1CD expresados en neuronas. Se muestra un histograma donde se expresa el rango de Dc para cada complejo $\alpha 1$ -FS estimado a partir del medio segundo inicial del movimiento.

Chapter V

DISCUSSION

4.1. Evaluation of different transfection techniques

The transfer of recombinant genes into a variety of eukaryotic cultured cells, commonly known as transfection, is an extensively used approach in gene expression studies. A large number of plasmid DNA delivery methods have been developed for mammalian cells. Calcium phosphate precipitation and DEAE-dextran transfection were two of the early methods developed for DNA delivery (Pari and Keown, 1997). These methods appear to facilitate DNA binding to cell membranes and entry of DNA into the cell via endocytosis. Both methods, as well as electroporation, tend to have harmful effects on the cells (Smith y cols., 1993).

Transfection by cationic liposomes is better tolerated by the cells and has the additional advantage of simplicity. Cationic liposomes interact efficiently with negatively charged nucleic acid molecules and DNA-bound lipids associate with the cell membrane, leading to DNA internalization. These synthetic molecules were first introduced by (Felgner *et al.*, 1987) and the number and variety of commercially available forms have increased greatly since.

As demand for rapid, high efficiency transfections becomes more intense, a number of other products, including non-liposomal lipids, synthetic polymers, etc., have been developed that mediate transport of genes into cells. However, a problem associated with the majority of non-viral gene-delivery agents is their relatively low transfection efficiency (Chen *et al.*, 2002).

A wide variety of factors can influence transfection efficiency. Essential parameters which should be taken into consideration when

optimizing transfection efficiency include cell type or cell line to be used, culture conditions, and transfection vector. For instance, certain cell types or lines are intrinsically easier to transfect than others, although the exact reason for these differences is currently unknown. Even clonal variability in DNA uptake has been reported in mouse L cells (Corsaro and Pearson, 1981). Another important factor influencing the success or failure of transfection is the quality of the transferred DNA, as well as its size, configuration, and quantity.

In order to study the implication of genes involved in neurotransmitter receptors lateral diffusion in neuronal and non neuronal cells, it was essential for us to transiently introduce recombinant plasmid DNA into HEK293; COS7, PC12 and cerebellar granule cells with high efficiency. We evaluated three transfection systems: liposome mediated transfection (three different liposome preparation were tested: Lipofectamine; Tmf 50; ESCORT); electroporation and calcium phosphate (CaPO₄) precipitation.

As an important conclusion, it is noted that any given transfection protocol needs to be optimized for a given cell line.

4.1.1. Liposome mediated transfection

Liposome mediated transfection was first described as a vehicle for the delivery into the cell of pharmacological active agents (Bangham, 1981) and followed by the introduction of genetic information (Straubinger and Papahadjopoulos, 1983; Cudd and Nicolau 1984 Felgner and Ringold, 1989).

We have tested three of the most commonly used liposome transfection reagents: Lipofectin (Gibco-BRL); Tfx-50 (Promega) and ESCORT (Sigma). We found relative high transfection efficiency with the use of these liposomal transfection methods, in agreement with Weiskirchen et al., 2000.

The highest relative efficiency was obtained with ESCORT gene mediated DNA transfer. Quantitative evaluation of representative transfection experiments by immunocytochemistry revealed that approximately 60% of HEK293 and COS7 cells were transfected. This method represents an easy way of transfection with low time of reaction and high efficiency.

The important advantages of TfxTM-50 on others existing lipidic systems, are their simplicity. A single culture tube for all the reactions is required and it does not use special solutions. The transfection can be made in an optimal time of two hours, which confers another advantage to the usual methods, which take between 4 and 20 h (Felgner and Ringold, 1989).

4.1.2. Calcium-phosphate precipitation technique

In the calcium-phosphate precipitation technique three essential aspects take part and are going to affect the formation of the precipitated. These are, the DNA concentration, the temperature and the time of the precipitation reaction (Jordan et al., 1996).

In general it is assumed that efficiencies between 60-70 % are the values to reach with optimal protocols when COS7 cells are transfected by this technique; and up to 38% of transfection efficiency for HEK-293 cells (Gluzman, 1981). We tried calcium phosphate (CaPO_4)

precipitation with the cells and obtained an average of 18% transfection, which is low efficiency considering the total amount of plasmid DNA used (40 µg). In agreement with Nikcevic *et al.*, (2003) we concluded that this is a time consuming method giving low transfection efficiency.

In summary, the adjustment of the concentration of the DNA, the temperature and time of the reaction, are parameters that have to be fixed independently for each cellular line.

4.1.3. Electroporation

Electroporation has been used to introduce DNA in an ample variety of animal cells (Neumann *et al.*, Wong and Neumann, 1982; Rols *et al.*, 1992) plant cells (Fromm *et al.*, 1982) and also in bacteria (Andreason *et al.*, 1988). Electroporation can indifferently be used for transiente or stable expression. The efficiency of transfeccion by electroporacion is influenced by a series of factors, the electrical field; time of the electrical pulse; temperature and DNA concentration.

The optimization of these parameters is a necessary requirement for each cellular line and makes electroporacion a tecniche of great versatility with an obvious advantage on the rest of the procedures: it allows transfeccion of recalcitrant cellular lines to other methods. We have found, in fact, that PC12 cells were very difficult transfected by the methods tested and only when electroporation was used the transfection efficyency went up to 40% of positive cells.

4.2. Adenovirus transfection. Potential uses in neurological disorders

The recombinant adenovirus vectors were first used in gene transfer in 1985 (Yamada *et al.*, 1985; Ballay *et al.*, 1985; Karlsson *et al.*, 1986). Since then, viruses have evolved a variety of complex and efficient means of delivering their genome to the nucleus of host cells and this gives them obvious potential as gene therapy agents. Recombinant adenoviruses are not capable of replicating themselves as efficiently as wild-type viruses, but are able to replicate efficiently in permissive host cells or packaging lines, such as 293 cells (human embryonic kidney cells transformed by sheared adenoviral genomic DNA) and 911 cells (E1- transformed human embryonic retinal cells) or other packaging lines, in which the E1 proteins are provided *in trans* (Schiedner *et al.*, 2000; Fallaux *et al.*, 1996; Graham *et al.*, 1977). Subsequently, a large quantity of recombinant adenovirus can be produced in 293 cells or other packaging cells and purified by CsCl gradient ultracentrifugation. A virus stock with a titer of 10^{11} to 10^{13} pfu/ml can be routinely prepared. The high density and complexity of the viral transcription units poses significant difficulties for recombinant manipulation, which therefore is usually restricted to specific regions, particularly E1, E2A, E3, and E4. Thus, the first generation viral vectors are usually recombinant adenoviruses that contain transgenes in replacing E1A and E1B genes. However, these vectors have several apparent limitations in their application as gene delivery vectors. First, these vectors have relatively limited packaging capacity and can only accommodate transgenes smaller than 5 kb (Bett *et al.*, 1993). Secondly, the E1-deficient adenoviruses still exert significant cytotoxicity to infected cells. In addition, they incite a

marked immune response in infected animals, which in turn, limits the duration and level of transgene expression and complicates the functional analysis. In the past few years, intensive and substantial efforts have been undertaken to improve the deficiency of the first generation adenoviral vectors, with particular emphasis on accommodating larger transgenes, reducing the cytotoxic effects in host cells, and diminishing the ability to elicit host immune response. For instance, the developed of adenoviral vectors with double deletions (DE1 and DE3) or triple deletions (DE1, DE3 and DE4) can accommodate up to 10-kb of foreign DNA (Bett *et al.*, 1995; Gao *et al.*, 1996; He *et al.*, 1998). Another second generation vector with double deletions of E1 and E2 was shown to prolong transgene expression and reduce cytotoxic effects *in vivo* (Engelhardt *et al.*, 1994; Engelhardt *et al.*, 1994; Schowalter *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1994).

Gene therapy is an exciting new discipline with direct impact on the treatment of neurological disorders. Unlike other organs, the brain has a blood-brain barrier (Medana and Turner, 2006), often preventing efficient systemic gene delivery to the area of interest (Tiwari and Amiji, 2006). Therefore, not only is gene delivery required, but it will often need to be accomplished in a local and specific manner. Although brain neoplasms have been the most commonly studied application of genetic therapeutics in neurological surgery (reviewed in Robertson, 2006), there are many other potential applications of this technology to neurosurgical disorders, including spinal instability, neurodegenerative disease, neurogenetic diseases, central nervous system (CNS) injury, aneurysms, trauma, stroke, and epilepsy. As the field of gene therapy for the CNS develops from the preclinical setting

to clinical trials to mainstream therapy, the need for safe and specific gene delivery will be increasingly apparent.

Studies of gene therapy involve either *ex vivo* transfection techniques, in which genetically modified cells are implanted into the brain, or direct gene transfer techniques, in which viral or nonviral vectors are used to insert foreign DNA directly into brain cells. Due to the difficulty in transfecting post-mitotic cells by conventional methods the development of viral transfer systems which can also transfect neurons has become a key new methodology in neuroscience research. Vector systems which are currently available (and are being developed further) for use in the CNS include adenoviral vectors, recombinant and defective herpes viral vectors, adeno-associated viral vectors and retroviral vectors. The efficient introduction of genetic material into quiescent nerve cells is important in the study of brain function and for gene therapy of neurological disorders.

The efficacy of adenoviral vectors has been demonstrated in several models of neurodegenerative diseases (Sonabend *et al.*, 2006) including Parkinson's disease (PD) and motor neuron diseases (Barkats *et al.*, 1998; Smith, 1998). In rat PD models, adenoviral vectors expressing either tyrosine hydroxylase, superoxide dismutase or glial-derived neurotrophic factor improved the survival and functional efficacy of dopaminergic cells (Corti *et al.*, 1999). In a search for therapeutic agents to treat another neurodegenerative disease, Huntington's Disease (HD), Bemelmans *et al.* delivered brain-derived neurotrophic (BDNF) factor via adenoviral vector to rat models (Bemelmans *et al.*, 1999). HD is a genetic disorder leading to the degeneration of striatal GABA-ergic output neurons and BDNF has been shown to be beneficial for striatal neuron survival. Their study

indicated that transfer of the BDNF gene was of therapeutic value for Huntington's disease. Similarly, intramuscular injection of an adenoviral vector encoding for neurotrophin-3 demonstrated substantial therapeutic effects in a mouse model of motor neuron degenerative disease. Interestingly, the immunosuppressant FK506 was shown to prolong adenovirus-mediated transgene expression in brain cells of experimental animals (Durham *et al.*, 1997).

To analyze if cerebellar granule cells were susceptible to adenoviral infection, we have inserted truncated GABA receptor subunits in the transgenic expression cassette of a recombinant adenoviral genome, as replacement for the E1 region. Viral particles of this replication-deficient Ad5-based reporter were able to infect 97% of rat cerebellar granule cells.

4.3. Applications of the recombinant adenovirus in the study of receptors dynamics

The mammalian central nervous system (CNS) is a highly complex integrative centre, processing a vast number of positive and negative inputs. Proper functioning of the brain depends on a delicate interplay between excitatory and inhibitory neurotransmission between neurons. The major inhibitory neurotransmitter in the vertebrate brain is gamma-aminobutyric acid (GABA).

GABA was originally identified as the principal agent in brain extracts capable of inhibiting crayfish stretch-receptor neurons, an

effect mediated by an increase in the membrane permeability to Cl⁻. This was followed by studies into the inhibitory role of this amino acid in crustacea, in vertebrate, and finally in the mammalian CNS, where it may function at up to 40% of the synapses in brain, (for review see Bennett and Balcar, 1999).

In this study a recombinant adenovirus vector was constructed in order to transfect cerebella granule cell with alpha1 chimeric sub-units of the GABA_ARs. The recombinant vector allowed us to study the dynamic behaviour of the expressed truncated sub-unit on the nerve cell. In addition this recombinant vector constituted a powerful tool for carry out electrophysiological experiment over-expressing those chimera sub-units.

The methodology used here can also be employ to construct other recombinant adenovirus with specific DNA insert to be used in research or even gene therapy.

We successfully transfected primary neurons with the recombinant adenovirus and proved that expressed complexes containing the truncated alpha1CD subunit (with no cytoplasmic loop) were freely mobile in contrast, complexes containing the truncated alpha1CH with the intact cytoplasmic loop M3/M4 showed a restricted mobility that resembled to be trapped into a cytoskeletal corral. This finding agree with Fritschy *et al.* (2003) who hypothesized that the sorting and synaptic targeting of GABA_AR is determined by interactions between specific associated proteins and appropriate sequence motifs present in particular subunits. The limitation of the lateral diffusion of GABA_AR could be due to interactions with the underlying cytoskeletal network,

interactions with others membrane proteins, or interactions with the extracellular matrix.

4.4. Studies of GABA receptors dynamics by SPT in COS7 cells

Accumulation or clustering of neurotransmitter receptors at postsynaptic sites is believed to be crucial for efficient synaptic transmission. However the mechanism by which GABA_AR are delivered to and maintained at synapses is still poorly understood. In a review presented by Lüscher and Keller (2004), GABA_AR synaptic localization seems to be in part encoded by structural determinants present on alpha1, 2, 3 and gamma subunits. Nevertheless, the same receptor subunits are also abundant at extrasynaptic sites, suggesting that receptors move in and out of the postsynaptic membrane.

Data of lateral diffusion of GABA_AR is still scarce; in this work we presented novel results from SPT experiments supporting the role of specific subunits in controlling lateral mobility of the receptors.

COS7 cells transfected with the beta3 subunit, were freely mobile on the cell surface. In contrast, alpha1beta3 subunit-containing receptors showed restricted mobility. This data suggest that the inclusion of the alpha1 subunit in the complex allow the formation of links with the cytoskeletal elements that tether the receptors at the cell surface.

SPT was used to gain insight into the mechanisms underlying receptor dynamics. SPT has the advantage of being able to track single receptors over different parts of the cell, to determine regional

differences, while at the same time exploring how large the cell surface domain might be.

A major advantage of SPT is the ability to resolve modes of motion of individual molecules, and a major result of the technique is that motion in the membrane is not limited to pure diffusion. Several modes of motion have been observed: immobile, directed, confined, tethered, normal diffusion, and anomalous diffusion. In an ensemble average, the time dependence of the mean-square displacement (MSD) for pure modes of motion is much different so the motion can be classified readily (Saxton, 1993, Saxton, 1994).

The forces that restrict GABAAR mobility and regulate distribution may arise from several possible kinds of interactions.

First, segregation to and confinement within an impermeable barrier or corral could define cell surface domains such as the cell body and the dendrite/axon. Examined using FPR, receptors within such a domain would appear clustered and immobile, but by SPT would appear mobile. Second, the receptor may be linked to specialized cytoskeletal elements in the cell body, dendrite, or axon. Such a link would have to be highly selective for GABAARs since other proteins and lipids diffuse freely between these regions (Winckler and Poo, 1996). SPT experiments show that despite clustering, homomeric beta3 complexes are quite mobile. When the alpha1 subunit is included, alpha1beta3 subunit complexes are completely immobilised in COS7, indicating the formation of a direct link to a component of the cytoskeleton. In fact, the interaction of the GABAAR alpha1 subunit with two main cytoskeletal components, tubulin and actin, has been shown (Kannenberget al., 1997). The results suggest that beta3 serves to cluster or aggregate receptors while the alpha1 subunit

provides a direct link that reduces complex mobility. The “movement” of these anchored receptors, which is less than 50 nm, is consistent with tensile cytoskeletal element(s) providing direct, but flexible attachment. The suggestion of direct anchoring is consistent with findings that GABA_ARs are clustered and immobile on hippocampal and cortical neurons (Velazquez et al., 1989).

The lateral diffusion of glutamate receptors in and out of synaptic sites has been reported (Borgdorff and Choquet, 2002; Sergé *et al.*, 2002; Tardin *et al.*, 2003). Although, the mechanisms that control GABA_ARs mobility have not been described yet. Many groups are involved in the study of proteins that may interact with GABA_ARs and cluster them to the membrane at precise postsynaptic regions. Several candidates such as GABARAP, Raft1 and Collibistin, Plic1 or dynein light chain 1 and 2 have been identified (Triller and Choquet, 2003). Yeast two hybrid and immunoprecipitation experiments showed that those proteins directly interact with gephyrin or inhibitory receptors.

Gephyrin is the core protein of the scaffold at inhibitory synapses and responsible for anchoring of the other main inhibitory neurotransmitter receptors, the glycine receptors, (Kirsch *et al.*, 1991; Kirsch and Betz, 1993). This led to the hypothesis that this protein may be involved in the anchoring of GABA_ARs. There are studies supporting the hypothesis that gephyrin (Craig *et al.*, 1994; Essrich *et al.*, 1998) might be involved in postsynaptic positioning of GABA_AR, but there are no clear “*in vivo*” evidence. In fact, the postsynaptic localization of alpha1subunit-containing GABA_A receptors in cultured hippocampal neurons and the clustering of these receptors in spinal cord sections from gephyrin knockout mice appear unaffected by loss of gephyrin (Kneussel *et al.*, 2001; Levi *et al.*, 2004). In addition, GABA_A receptors can form clusters in immature neurons before being

detectably colocalized with gephyrin (Dumoulin *et al.*, 2000 and Danglot *et al.*, 2003). Thus, in contrast to glycine receptors, gephyrin does not appear to interact directly with GABA_A receptors. Gephyrin may function by tapping receptors, anchoring receptors or otherwise maintaining synaptic receptor clusters, rather than by inserting receptors in the plasma membrane. Experiments showing that disruption of microtubules with colchicines do not affect gephyrin clustering in mature neurons *in vitro* (Allison *et al.*, 1988; Van Zundert *et al.*, 2002) led to the hypothesis that aggregation of GABA_AR and gephyrin at synaptic sites reflects a dynamic equilibrium and is not dependent on stable interaction with the tubulin cytoskeleton. So it seems that gephyrin is not responsible for immobilization of GABA_AR.

Receptor clustering by scaffold proteins could explain receptor immobility. However, movement of individual clusters of receptors with or without interaction with scaffolding proteins has been shown in real time using single particle tracking in cultured neurons (for review see Triller and Choquet, 2003). In addition, we have found that the lateral mobility of the receptor was no dependent on receptor clustering. Although this data agree with Sergé *et al.*, 2002, we did not find the lower diffusion coefficient for clustered receptors that they described. It seems then, that the binding of clustered receptors to rigid elements such as the cytoskeleton is necessary for immobilization.

4.5. Studies of GABA receptors dynamics by SPT in neurons

It is broadly believed that GABA_AR molecular heterogeneity determines biophysical and pharmacological properties of the receptor (for review see Sieghart, 2000). In addition, there are strong evidences of the localization of GABA_ARs not only at synaptic

sites but also at presynaptic and axonal sites (Nusser *et al.*, 1998, Sakatani *et al.*, 1991, Kullmann *et al.*, 2005). However, it is not clear whether these neurotransmitter receptors are edited and routed to their final postsynaptic domains or if a freely mobile pool of receptors is maintained on the cell surface. Neuronal demands could recruit these free receptors to specific regions of the neuronal membrane. The lateral movement in the plasma membrane represents a mechanism by which the local GABA_AR concentration might be regulated to adjust the efficacy of synaptic inhibitory transmission (Velazquez and Angelides, 1989). In fact, we have previously shown that the diversity of subunits isoforms also determines distribution and mobility of GABA_AR on the nerve cell surface (Perán *et al.*, 2001, 2004).

The use of quantum dot labeling of single glycine receptor molecules (Dahan *et al.*, 2003) or single-molecule fluorescence microscopy of AMPA receptors (Tardin *et al.*, 2003) have confirmed as well, that individual neurotransmitter receptor molecules can be observed moving in and out of synapses independent of endocytosis. Several groups are involved in the study of how GABA_AR are anchored and maintained at specific membrane domains (review in Lüscher and Keller 2004). Their approaches, however, depends on biochemical reconstitution of the system. The study presented here has approached the problem of receptor anchoring and identification of the molecular interactions in a different manner. Thus, attention was focused on the membrane dynamics of the receptor, measuring its lateral mobility by using SPT. SPT is a powerful tool that permits the lateral motions of single receptors in the membranes of single, living cells to be examined

under physiological conditions (Kusumi and Sako, 1996; Babcock et al., 2004).

We have already provided evidence, using SPT in COS7 transfected cells, that GABA_ARs containing the alpha1 subunit have a restricted lateral mobility.

Because the major amino acid sequence divergence between alpha subunit isoforms is found in the M3/M4 cytoplasmic domain, we hypothesised that this region might potentially mediate alpha1 subunit-specific association with the cytoskeleton and/or confine receptors to specific neuronal domains. The intracellular loop M3/M4 contributes most of the cytoplasmic domain of these receptors and includes multiple interaction sites for putative trafficking and postsynaptic scaffold proteins as well as phosphorylation sites for diverse serine/threonine and tyrosine kinases (Lüscher and Keller, 2004). In addition, this region of the alpha1 subunit might contain a retention motif responsible for the retention of recombinant alpha1 subunit homo-oligomers in an intracellular compartment (Peran et al., 2001).

The information acquired using non-neuronal cells (COS7 cells) can be useful to elucidate the molecular mechanisms underlying neurotransmitter receptor anchoring. While these experiments are indicative, it is necessary to extend the study to cells of the central nervous system to have a more realistic understanding of the processes involved in directing the distribution and cell surface maintenance of GABA_AR in neurons. To do so, the mobility of recombinantly expressed GABA_ARs were analysed in cultured rat cerebellar granule cells. The alpha1 subunit constructs, alpha1CH (bovine/rat chimera) and alpha1CD (with the M3/M4 cytoplasmic loop excised) were transfected, by the recombinant adenovirus, into

cultured rat cerebellar granule cells. This was performed, in order to investigate the role the cytoplasmic loop domain plays in receptor tethering in a well-characterised neuronal preparation, *in vitro*.

The advantages of using SPT in the study of GABA_ARs allowed us to investigate in a non-invasive way the behaviour of this receptor in living cells.

SPT experiments show that despite clustering, GABA_AR that included the truncated alpha1CD subunit are quite mobile. On the other hand when the chimeric alpha1CH subunit is included, the complexes are completely immobilised on cerebellar granule cells. These results may indicate the formation of a direct link between the M3/M4 cytoplasmic loop of the alpha1 subunit to a component of the cytoskeleton. In fact, the interaction of the GABA_AR alpha1 subunit with two main cytoskeletal components, tubulin and actin, has been shown (Kannenberget al., 1997).

There are two possible explanations for SPT results in neurons, an impermeable barrier or corral might determine the existence of cell surface domains or the receptor may be linked to specialized cytoskeletal elements in the cell body. The suggestion of direct anchoring is consistent with findings that GABA_ARs are clustered and immobile on hippocampal and cortical neurons (Velazquez et al., 1989).

4.6. Truncated alpha1 were able to assembly into GABAAR but showed a differential distribution pattern

Functional receptor complexes are formed by diverse subunits. Proper folding and assembly of the subunits that constitute a receptor

is required for the delivery of multimeric proteins to the membrane. Therefore, heterodimerization is a mechanism that enables the cells to restrict traffic to the cell membrane only to those receptor properly assembled. In some receptors, a specific ER retention signal contained in one subunit is masked by other type of subunit during receptor assembly (Zerangue *et al.*, 1999; Bichet *et al.*, 2000; Margeta-Mitrovic *et al.*, 2000).

There are many studies reporting the localization of ER retention signal in other neurotransmitter channels. For instance deletion of a retention signal within the I-II loop of the Ca²⁺ channel alpha 1 subunit facilitates the expression of this subunit in absence of beta (Bichet *et al.*, 2000). In NMDA receptors, an RXR-type ER retention/retrieval motif in the C-terminal tail of the NR1 subunit has been described (Scott *et al.*, 2001). In kainate receptor intracellular retention of the KA2 subunit is mediated through discrete protein trafficking signals, including an arginine-rich ER retention/retrieval motif and a di-leucine endocytic sequence in the C terminus of the KA2 subunit A (Ren *et al.*, 2003).

In addition, studies have been carried out in the type B GABA receptors. Thus, a RXR motif present in GABAB receptor GB1 subunits is masked by assembly with GB2, ensuring heterodimerization (Margeta-Mitrovic *et al.*, 2000; Calver *et al.*, 2001; Pagano *et al.*, 2001, Villemure *et al.*, 2005).

In this study we have found that the chimeric alpha1 subunits were able to co-assemble with the native subunits of the rat cerebellar granule cells. These truncated subunits were localized on the cell

membrane in a clustered pattern. Thus, we show new evidence that the lack of the M3/M4 cytoplasmic domain of the alpha1 subunit does not prevent the proper assembly of the subunit into the GABAAR complex.

In conclusion, the M3/M4 cytoplasmic loop of the alpha1 subunit appears not to be involved in subunit targeting to the cell surface, subunit-subunit assembly nor receptor aggregation.

4.6.1. Localization of the chimera alpha1 subunits on transfected neurons

Immunocytochemical localization of the expressed receptors containing the truncated alpha1 subunits showed a differential distribution pattern. When the alpha1CD expressing cells were analysed, the fluorescence was found to be restricted mainly to the cell soma. It seemed that the receptors were not able to leave this central location and migrate to the dendrites, although they still formed large receptor clusters. On the other hand, control receptors (alpha1CH-containing), were distributed clustered along both the soma and the dendrites of the neuronal cell. These results indicate that the deletion of the intracellular loop of the alpha1 subunit dictates that the receptor is retained in the soma, but none-the-less is freely mobile. The alpha1CH-containing receptors that are representative of native receptors are anchored throughout the entire cell surface.

Cerebellar granule cells show a relatively simple synaptic organisation, they are activated by glutaminergic mossy fibers and receive GABA from local Golgi cells only on their distal dendrites (Ottersen *et al.*, 1988), thus the data presented here may indicate

that receptors containing the truncated alphaCD subunit are "in some way" not allowed to reach a synaptic location but are retained in the cell soma.

4.7. New model of receptor dynamic

From the data presented here a new model of GABA receptor dynamic can be suggested. GABA_ARs may interact *via* the cytoplasmic loop of the alpha1 subunit with scaffold proteins, see Figure 3. Those scaffold proteins, not linked to the cytoskeleton, act as ballast avoiding the free lateral diffusion of the receptors. The receptors are derived to the synapses by the involvement of another type of proteins that are linked to the cytoskeleton and actively transport the scaffold-receptor complex to the synapse operating as a barge. Those "barge proteins" may respond to concentration variation of regulatory molecules due to neuronal activity. In fact, AMPA receptors mobility have been prove to be modulated by Ca²⁺ increases (Borgdorff and Choquet, 2002), indicating that neuronal activity can regulate lateral diffusion of the receptors (Groc *et al.*, 2004). Synapse is a highly specialized and organized domain of the neuron. A perfect match between the secreted neurotransmitter and the apposed postsynaptic receptors need to be gained (Craig and Bourin, 2001). For these reasons the entry to the synapse of neurotransmitter receptors must be a very well regulated mechanism. We postulate that the scaffold proteins would provide the receptors with the "passport" necessary to entry the synapse domains. Only receptors containing the appropriate subunit composition will be able to interact with the suitable scaffold proteins and reach a synaptic localisation. In fact, we have shown that receptors containing the truncated alpha1CD lacking the cytoplasmic loop were not able to

leave the soma. Those receptors could not interact with the scaffold proteins. In addition, receptors containing truncated alpha1CD together with endogenous alpha1 subunits are less mobile but nevertheless did not show a totally free diffusion. The native alpha1 subunit included in the complex will act as ballast, but will not be enough to completely immobilize the receptors.

The association of scaffold molecules with neurotransmitter receptors outside the synapse and their participation in the regulation of the trafficking have been described elsewhere (DeSouza *and Ziff*, 2002; Wenthold *et al.*, 2003; Meier and Grantyn, 2004). Further complexity on the processes that localize inhibitory neurotransmitter receptors at postsynaptic sites emerges from GABA_ARs comprising a highly heterogeneous set of membrane proteins that are differentially expressed in the mammalian CNS. New findings in the study of GABA_ARs support the idea that the subunit composition of the complexes determines the type of scaffold proteins that bind to the receptors (reviewed in Lüscher and Keller, 2004). For instance, Gephyrin and dystrophin have been described as clustering proteins for GABA_ARs. Although, these proteins seem to regulate the synaptic clustering of GABA_ARs, they do so by distinct mechanism (Knuesel *et al.*, 1999).

In conclusion, even though our knowledge of the synaptic mechanism has increased in the last years still much is unknown. The heterogeneity of the described scaffold proteins that bind GABA_ARs, and the possible ones which have not been described yet, make the neuronal membrane a highly specialized mechanism.

Here we presented a novel study in neuronal cells that show a direct implication of the M3/M4 cytoplasmic loop of the alpha1 subunit in restricting the lateral mobility of GABA_ARs. These results are preliminary, but nevertheless very relevant and we hope will help to gain a better understanding of the complexity neuronal synaptic plasticity.

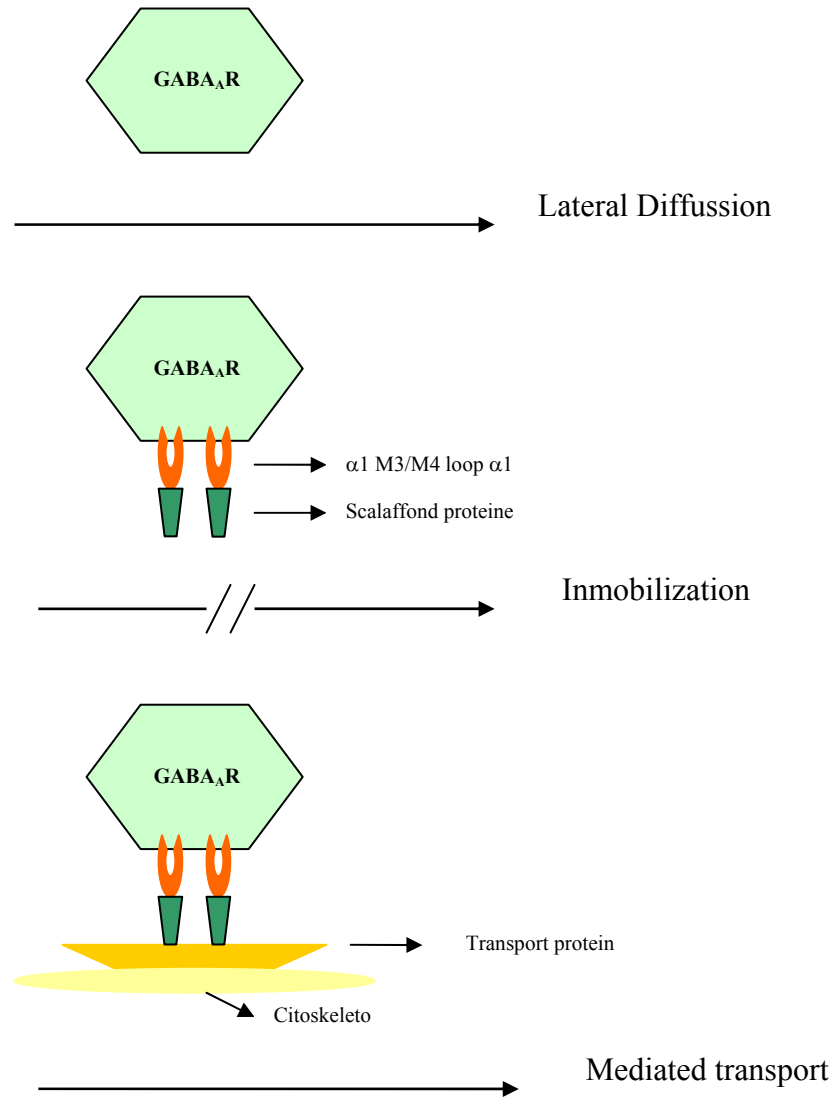


Figure 40. Model of GABA_A R dynamic

Capítulo VI
CONCLUSIONES

1. Tras la valoración de los métodos de transfección comunmente usados en los laboratorios se concluyó:
 - 1.1. Cada método de transfección debe ser optimizado para cada línea celular.
 - 1.2. Los métodos de transfección liposomales son los que rinden la mayor eficiencia de transfección en las células COS7 y HEK293. Son métodos de simple aplicación; de bajo coste económico; de alta viabilidad celular tras la transfección y de fácil puesta a punto.
 - 1.3. Las células neuronales no se transfectan eficazmente con métodos no virales de transfección.

2. Se presenta la optimización del método de construcción de adenovirus recombinantes que permite la introducción, en dichos vectores virales, de cualquiera de las otras subunidades de los receptores GABA.

3. Se construyó un nuevo adenovirus recombinante que incluye subunidades quiméricas del receptor GABA. Creándose una herramienta muy útil para estudios que impliquen transfección en células no replicantes.

4. La infección de las células neuronales con el adenovirus recombinante creado rinde un 97% de eficacia de transfección frente al 2% obtenido con los métodos tradicionales.

5. La segregación y la movilidad lateral de los receptores de GABAA está determinada por las sub-unidades que componen el complejo.
6. La inclusión de la sub-unidad beta 3 en un receptor de GABAA es necesaria para transportar el complejo hasta la superficie celular.
7. La sub-unidad alfa 1 de los receptores de GABA es responsable del anclaje del receptor a la membrana. Receptores que incluyen esta subunidad presentan una restricción en su desplazamiento lateral.
8. El dominio citoplasmático M3/M4 de la sub-unidad alfa 1 es la región de dicha subunidad que determina la inmovilización de los receptores en la membrana plasmática.
9. El dominio citoplasmático M3/M4 de la sub-unidad alfa 1 permite la unión del receptor al citosqueleto mediante proteínas "andamio".
10. Los resultados del estudio de la dinámica del receptor GABA son novedosos y sirven de base para futuros estudios del comportamiento de las proteínas de membrana de las células neuronales.

Capítulo VII

BIBLIOGRAFÍA

- Akali S., Caillaud C., Vigne E., Perricaud L.D., Poenaru L., Perricaudet M., y cols. Transfer of a foreign gene into the brain using adenovirus vectors. *Nature Genet.* 1993; 3: 224-228
- Alkatib G., Massie B., and Briedis D.J. Expression of bicistronic measles virus P/C mRNA by using hybrid adenoviruses: level of C protein synthesized *in vivo* are unaffected by the presence or absence of the upstream P initiator codon. *J. of Virology.* 1988; 62: 4059-4069.
- Alton E.W., Middleton P.G., Caplen N.J., Smit S.N., Steel D.M., Munkonge F.M., y cols. Non-invasive liposomes-mediated gene delivery can correct the ion transport defect in cystic fibrosis mutant mice. *Nat. Genet.* 1993; 5: 135-142.
- Anderson W.F. Human gene therapy. *Science.* 1992; 256: 808-813.
- Anderson R. G. W. and Jacobson K. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts and other lipid domains. *Science.* 2002; 296: 1821-1825.
- Andreason GL, Evans GA. Introduction and expression of DNA molecules in eukariotic cell by electroporation. *BioTechniques.* 1988; 6:50-53.
- Babcock HP, Chen C, Zhuang X. Using single-particle tracking to study nuclear trafficking of viral genes. *Biophys J.* 2004; 87(4):2749-58
- Ballay A., Levrero M., Buendia M. A. Tiollais P. and Perricaudet M. In vitro and in vivo synthesis of the hepatitis B virus surface antigen and of the receptor for polymerized human serum albumin from recombinant human adenoviruses, *EMBO J.* 1985; 4: 3861-3865.
- Bangham AD. Introduction. In: Knight G, editor. *Liposomes from Physical Structure to Therapeutic Application.* North-Holland, New York: Elsevier, 1981.
- Barkats M, Bilanz-Bleuel A, Buc-Caron MH, et al: Adenovirus in the brain: recent advances of gene therapy for neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol.* 1998; 55:333-341,
- Barkat M., Bilanz-Bleuel A., Buc-Caron MH., Castel-Barthe MN., Corti O., Finiels F., Horellou P., Revah F., Sabate O. and Mallet J. Adenovirus in

- the brain: recent advances of gene therapy for neurodegenerative diseases, *Prog Neurobiol.* 1998; 55: 333-341.
- Baude A, Nusser Z, Molnar E, McIlhinney RAJ and Somogyi P. High-resolution Immunogold Localisation of AMPA Type Glutamate Receptor Subunits at Synaptic and Non-Synaptic Sites in Rat Hippocampus. *Neurosci.* 1995; 69: 1031-1055
 - Bemelmans, A. P., Horellou, P., Pradier, L., Brunet, I., Colin, P. and Mallet, J. Brain-derived neurotrophic factormediated protection of striatal neurons in an excitotoxic rat model of Huntington's disease, as demonstrated by adenoviral gene transfer, *Hum Gene Ther.* 1999; 10: 2987-2997.
 - Bennett MR and Balcar VJ Forty years of amino acid transmission in the brain. *Neurochem. Int.* 1999; 35: 269-280.
 - Bergelson J.M., Cunningham J.A., Droguett D., Kurt-Jones E.A. Krithivas A., Hong J.S., Horwitz M.S., Crowell R.L. and Finberg R.W. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and Adenoviruses 2 and 5. *Science.* 1997; 275: 1320-1323.
 - Berkner K.L. Development of adenovirus vectors for the expression of heterologous genes. *Biotechniques.* 1988; 6: 616-629.
 - Bett A. J., Krougliak V. and Graham F. L. DNA sequence of the deletion/insertion in early region 3 of Ad5dl309, *Virus Res.* 1995; 39: 75-82.
 - Bett A.J., Prevec L. and Graham FL. Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors, *J Virol.* 1993; 67: 5911-5921.
 - Bichet D, Cornet V, Geib S, Carlier E, Volsen S, Hoshi T, Mori Y, De Waard, M. The I-II loop of the Ca²⁺ channel alpha 1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuro.* 2000. 25(1):177-90
 - Borgdorff A, Choquet D. Regulation of AMPA receptor lateral movement. *Nature.* 2000; 417:649-653.
 - Brakeman PR, Lanahan AA, O'Brien R, Roche K, Barnes CA, Huganir RL and Worley PF. *Nature.* 1997; 386: 284-288.

- Brody S.L., Jaffe H.A., Han S.K., Wersto R.P., Crystal R.G. Direct in vivo gene transfer and expression in malignant cells using adenovirus vectors. *Hum. Gene Ther.*, 1994; 5: 437-447.
- Burden SJ, DePalma RL and Gottersman GS Crosslinking of proteins in acetylcholine receptor-rich membrane: association between the α -subunit and the 43 kd subsynaptic protein. *Cell*. 1983; 35: 687-692
- Bussell SJ, Koch DL, Hammer DA.. Effect of hydrodynamic interactions on the diffusion of integral membrane proteins:diffusion in plasma membranes. *Biophys. J.* 1995a; 68:1836–49
- Bussell SJ, Koch DL, Hammer DA. Effect of hydrodynamic interactions on the diffusion of integral membrane proteins: tracer diffusion in organelle and reconstituted membranes. *Biophys. J.* 1995b ;68:1828–35
- Calver AR, Robbins MJ, Cosio C, Rice SQ, Babbs AJ, Hirst WD, Boyfield I, Wood MD, Russell RB, Price GW. The C-terminal domains of the GABA(b) receptor subunits mediate intracellular trafficking but are not required for receptor signalling. *J Neurosci.* 2001; 21:1203-1210.
- Chang L.-S. and T. Shenk, The adenovirus DNA-binding protein stimulates the rate of transcription directed by adenovirus and adeno-associated virus promoters. *J. Virol.* 1990; 64:2103–2109.
- Chen C, Okayama H. Calcium phosphate-mediated gene transfer: A highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *BioTechniques* 1988;6:632.
- Chen Q.-R., L. Zhang, P.W. Luther and A.J. Mixson, Optimal transfection with the HK polymer depends on its degree of branching and the pH of endocytic vesicles. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30:1338–1345
- Clark K. R., X. Liu, J. P. McGrath and P. R. Johnson, Highly purified recombinant adeno-associated virus vectors are biologically active and free of detectable helper and wild-type viruses. *Hum Gene Ther.* 1999; 10:1031–1039.
- Cohen MW, Jones OT and Angelides KJ. Distribution of Ca^{2+} Channels on Frog Motor Nerve Terminals Revealed by Fluorescent w-Conotoxin. *J. Neurosci.* 1991; 11: 1032-1039.

- Collingridge GL, Isaac JTR and Wang YT . Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nature reviews neuroscience*. 2004; 5: 952-962.
- Corsaro C.M. and M.L. Pearson, Competence for DNA transfer of ouabain resistance and thymidine kinase: clonal variation in mouse L-cell recipients. *Somat Cell Mol Genet*.1981; /:617–630.
- Corti, O., Sanchez-Capelo, A., Colin, P., Hanoun, N., Hamon, M. and Mallet, J. Long-term doxycyclinecontrolled expression of human tyrosine hydroxylase after direct adenovirus-mediated gene transfer to a rat model of Parkinson's disease, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96: 12120-12125.
- Craig AM and Boudin H. Molecular heterogeneity of central synapses: afferent and target regulation. *Nat Neurosci*. 2001. 4: 569-578.
- Crystal, R.G. Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science*. 1995; 270: 404-410.
- Cudd A, Nicolau C. Entrapment of recombinant DNA in liposomes and its transfer and expression of eukaryotic cells. *Liposome Technology vol. II*. Boca Raton: CRC. 1984; 207-221
- Deisseroth K and Malenka RC. GABA Excitation in the Adult Brain: A Mechanism for Excitation- Neurogenesis Coupling. *Neuron*. 2005; 47(6): 775-777
- deSouza S, Ziff EB. AMPA receptors do the electric slide. *Sci STKE*. 2002 156:PE45.
- Dietrich, C., B. Yang, T. Fujiwara, A. Kusumi and K. Jacobson. Relationship of lipid rafts to transient confinement zones detected bsingle particle tracking. *Biophys. J*. 2002; 182: 274-284.
- Dodd TL, Hammer DA, Sangani AS, Koch DL. Numerical simulations of the effect of hydrodynamic interactions on diffusivities of integral membrane proteins. *J. Fluid Mech*. 1995; 293:147–80.
- Dong H, O´Brien RJ, Fung ET, Lanahan AA, Worley PF and Huganir RL GRIP: a synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors. *Nature*. 1997; 386: 279-284.

- Dougherty J.P., Wisniewski R., Yang S., Rhode B.W., Temin H.M. New retrovirus helper cells with almost no nucleotide sequence homology to retroviral vectors. *J. Virol.*, 1989; 63(7): 3209-3212
- Durham, H. D., Alonso-Vanegas, M. A., Sadikot, A. F., Zhu, L., Lochmuller, H., Massie, B., Nalbantoglu, J. and Karpati, G. The immunosuppressant FK506 prolongs transgene expression in brain following adenovirus-mediated gene transfer, *Neuroreport*. 1997; 8: 2111-2115.
- Edidin M. Molecular associations and membrane domains. *Curr. Top. Membr. Transp.* 1990; 36:81-96
- Edidin M. Translational diffusion of membrane proteins. In *The Structure of Biological Membranes*, ed. P Yeagle, Boca Raton: CRC. 1992; pp. 539-72.
- Edidin M.. Fluorescence photobleaching and recovery, FPR, in the analysis of membrane structure and dynamics. In *Mobility and Proximity in Biological Membranes*, ed. S Damjanovich, J Szollosi, L Tron, M Edidin, Boca Raton: CRC. 1994. pp. 109-35
- Edidin M. Lateral mobility of membrane proteins—a journey from heterokaryons to laser tweezers. In *The Legacy of Cell Fusion*, ed. S Gordon Oxford: Oxford Univ. Press. 1994; pp. 101-14.
- Engelhardt, J. F., Litzky, L. and Wilson, J. M. Prolonged transgene expression in cotton rat lung with recombinant adenoviruses defective in E2a, *Hum Gene Ther.* 1994; 5: 1217-1229.
- Engelhardt, J. F., Ye, X., Doranz, B. and Wilson, J. M. Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91: 6196-6200.
- Englehardt J.E., Ye X., Doranz B., Wilson J.M. Ablation of E2a in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994; 91: 6196-6200.

- Essrich C, Lorez M, Benson JA, Fritschy J-M and Lüscher B Postsynaptic clustering of major GABA_A receptor subtypes requires the gamma subunit and gephyrin. *Nature Neurosci.* 1998; 1: 563-571
- Fallaux, F. J., Kranenburg, O., Cramer, S. J., Houweling, A., Van Ormondt, H., Hoeben, R. C. and Van Der Eb, A. J. Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors, *Hum Gene Ther.* 1996; 7: 215-222.
- Feder TJ, Brust-Mascher I, Slattery JP, Baird B, Webb WW. Constrained diffusion or immobile fraction on cell surfaces: a new interpretation. *Biophys. J.* 1996; 70:2767-73.
- Felgner P.L., T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz *et al.*, Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84: 7413-7417.
- Felgner PL, Ringold GM. Cationic liposome-mediated transfection. *Nature.* 1989;337:387-388
- Fisher LJ: Neural precursor cells: applications for the study and repair of the central nervous system. *Neurobiol Dis.* 1997; 4:1-22.
- Flotte T. R., X. Barraza-Ortiz, R. Solow, S. A. Afione, B. J. Carter and W. B. Guggino, An improved system for packaging recombinant adeno-associated virus vectors capable of *in vivo* transduction. *Gene Ther.* 1995. 2: 29-37
- Fritschy JM, Schweizer C, Brunig I, Luscher B. Pre- and post-synaptic mechanisms regulating the clustering of type A gamma-aminobutyric acid receptors (GABAA receptors). *Biochem Soc Trans.* 2003; 4:889-92
- Fromm M, Taylor LP, Walbot V. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985;82:5824-5831
- Fujiwara, T., K. Ritchie, H. Murakoshi, K. Jacobson and A. Kusumi. Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *J. Cell Biol.* 2002; 157: 1071-1081.

- Gao, G. P., Yang, Y. and Wilson, J. M. Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liverdirected gene therapy, *J Virol.* 1996; 70: 8934-8943.
- Garnier, A., Coté, J., Nadeau, I., Kamen, A. and Massie, B. Scale-up of the adenovirus expression system for the production of recombinant protein in human 293S cells. *Cytotechnology.* 1994; 15: 145-155.
- Gaus K, Zech T, Harder T. Visualizing membrane microdomains by Laurdan 2-photon microscopy. *Mol Membr Biol.* 2006;23(1):41-8.
- Giorno, R. and Kates, J.R. Mechanism of inhibition of vaccinia virus replication in adenovirus infected HeLa cells. *J. of Virology.* 1971; 7: 208-213.
- Glorioso J.C., Deluca N.A., Fink D.J. Development and application of herpes simplex virus vectors for human gene therapy. *Annu. Rev. Microbiol.* 1995; 49: 675-710.
- Gluzman Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell.* 1981;23:175-182.
- Gordana Nikcevic, Natasa Kovacevic-Grujicic and Milena Stevanovic. Improved transfection efficiency of cultured human cells. *Cells Biol Interna.* 2003; 27:9. 735-737.
- Graham FL, van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology.* 1973;52:456-461.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W. C. and Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5, *J Gen Virol.* 1977; 36: 59-74.
- Green, M. and Daech, G.E. Biochemical studies on adenovirus multiplication. I. Kinetics of nucleic acid and protein synthesis in suspension cultures. *Virology.* 1961; 13: 169-176.
- Grinsberg, H.S., Lundholm, U. and Linne, T. Adenovirus DNA binding protein in cells infected with wild type 5 adenovirus and two DNA minus, temperature sensitive mutants, H5ts125 and H5ts 149. *J. of Virology.* 1977; 23: 142-151.

- Groc L, Heine M, Cognet L, Brickley K, Stephenson FA, Lounis B and Choquet D. Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nature Neuroscience*. 2004; 7:695-696.
- Hadingham L, Wingrove PB, Wafford KA, Bain C, Kemp JA, Palmer KJ, Wilson AW, Wilcox AS, Sikela JM, Ragan CI, et al.. Role of the beta subunit in determining the pharmacology of human gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Mol Pharmacol*. 1993; 44:1211-1218.
- He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW and Vogelstein B A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998; 95: 2509-2514
- Hodgson J. UK rules out new gene therapy laws. *Nature*. 1993; 366: 194
- Horwitz M.S. Adenoviridae and their replication. In *virology*, ed. BN Fields, DM Knipe, New York: Raven, 1990; pp 1679-1721.
- Inoue N. and D. W. Russell, Packaging cells based on inducible gene amplification for the production of adeno-associated virus vectors. *J. Virol*. 1998, 72: 7024-7031.
- Jacobson K, O'Dell D, August JT. Lateral diffusion of an 80,000-dalton glycoprotein in the plasma membrane of murine fibroblasts: relationships to cell structure and function. *J. Cell Biol*. 1984; 99:1624-33 52.
- Jordan M, Schallhorn A, Wurm FM. Transfecting mammalian cells: Optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucl Acids Res*. 1996;24:596-601
- Kannenberg K, Baur R and Sigel E. Proteins associated with alfa1-subunit-containing GABA_A receptors from bovine brain. *J. Neurochem*. 1997; **68**: 1352-1360.
- Karlsson, S., Van Doren, K., Schweiger, S. G., Nienhuis, A. W. and Gluzman, Y. Stable gene transfer and tissuespecific expression of a human globin gene using adenoviral vectors, *Embo J*. 1986; 5: 2377-2385.

- Kenworthy, A. K., B. J. Nichols, C. L. Remmert, G. M. Hendrix, m. Kumar, J. Zimmerberg and J. Lippincott-Schwartz. Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface. *J. Cell Biol.* 2004; 165: 735-746.
- Kirsch J Assembly of signaling machinery at the postsynaptic membrane. *Current Opinion in Neurobiology.* 1999; 9: 329-335
- Kneussel M, Hermann A, Kirsch J and Betz H Hydrophobic interactions mediate binding of the glycine receptor gamma-subunit to gephyrin. *J. Neurochem.* 1999; 72: 1323-1326.
- Knuesel I, Mastrocola M, Zuellig A, Bornhauser B, Schaub MC and Fritschy J-M. Altered synaptic clustering of GABAA receptors in mice lacking dystrophin (mdx mice). *European Journal of Neuroscience.* 1999; 11: 4457-4462.
- Kruger M., Berger C., Wong-Staal F. Use of ribozymes to inhibit gene expression. *Meth. Enzymol.* 1999; 306: 207-225
- Kullmann DM, Ruiz A, Rusakov DM, Scott R, Semyanov and Walker MC. Presynaptic, extrasynaptic and axonal GABAA receptors in the CNS: where and why? *Progress in Biophysics and Molecular Biology.* 2005; 87: 33-46.
- Kusumi A, Sako Y. Cell surface organization by the membrane skeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 1996; 8(4):566-74.
- Lamarche, N., Massie, B., Richer, M., Paradis, H. and Langelier, Y. High level expression in 293 cells of the herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase subunit 2 using an adenovirus vector. *Journal of General Virology.* 1990; 71: 1785-1792.
- Lazo P.A. Human gene therapy: trends and current problems. *Medicina Clinica.* 1996; 106(12): 469-476.
- LeGal LaSalle, G., Robert, J.J., Berrard, S., Ridoux, V., Stratford-Perricaudet, L.D., Perricaudet, M., Mallet, J. An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain. *Science.* 1993; 259: 988-990.

- Lindberg, U., Persson, T. and Philipson, L. Isolation and characterization of adenovirus mRNA in productive infection. *J. of Virology*. 1972; 10: 909-919.
- Lüscher B, Keller CA. Regulation of GABA_A receptors trafficking, channel activity, and functional plasticity of inhibitory synapses. *Pharmacol Therapeut*. 2004; 102(3):195-221
- Margeta-Mitrovic M, Jan YN, Jan LY. A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuro*. 2000; 27(1):97-106.
- Markowitz D., Goff S., Bank A. A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J. Virol*. 1988; 62: 1120-1124.
- Massie, B., Dionne, J., Lamarche, N., Fleurent, J. and Langelier, Y. Improved adenovirus vector provides herpes simplex virus ribonucleotide reductase R1 and R2 subunits very efficiently. *Bio/Technology*. 1995; 13: 602-608.
- Massie, B., Gluzman, Y., and Hassell, J.A. Construction of a helper-free recombinant adenovirus that expresses polyomavirus large T antigen. *Mol. Cell. Biol*. 1986; 8: 2872-2883.
- Massie, B., Langelier, Y., and Lamarche, N. High-level recombinant protein production using conditional helper-free adenovirus vector. U.S. Patent # 5,518,913 May 21, 1996.
- Massie, B., Mosser, D.D., Koutroumanis, M. et al. New adenovirus vectors for protein production and gene transfer. *Cytotechnology*. 1998B; 28: 53-64.
- McGuire, P.M., Piatak, M. and Hodge, L.D. Nuclear and cytoplasmic adenovirus RNA. Differences between 5'-termini of messengers and non-messenger transcripts. *J. Mol. Biol*. 1976; 101: 379-396.
- McKernan R.M. and Whiting P.J. What GABA receptor subtypes really occur in the brain. *TINS*. 1996; 19: 139-143.
- Mclachlin J.R., Mittereder N., Daucher M.B., Kadan M., Eglitis M.A. Factors affecting retroviral vectors function and structural integrity. *Virology*. 1993; 195: 1-5.

- Medana IM, Turner GD. Human cerebral malaria and the blood-brain barrier. *Int J Parasitol.* 2006 Mar 10; [Epub ahead of print]
- Meier J, Grantyn R. Preferential accumulation of GABAA receptor gamma 2L, not gamma 2S, cytoplasmic loops at rat spinal cord inhibitory synapses. *J Physiol.* 2004, 559(Pt 2):355-65.
- Meyer G, Kirsch J, Betz H and Langosch D Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor beta subunit. *Neuron.* 1995; 15: 563-72.
- Miller A.D. Human gene therapy comes of age. *Nature.* 1992; 357: 455-460
- Mitani K., Graham F.L., Caskey C.T. Transduction of human bone marrow by adenoviral vector. *Hum. Gene Ther.* 1994; 5: 941-948.
- Mittal S.K., McDermott M.R., Johnson D., Prevec L., Graham F.L. Monitoring foreign gene expression by human adenovirus-based vector using the fire-fly luciferase gene as reporter. *Virus Res.* 1993; 28: 67-90.
- Moerner, W. E. and D. P. Fromm. Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy. 2003; 74: 3597-3619.
- Morgan R.A., Anderson W.F. Human gene therapy. *Ann. Rev. Biochem.* 1993; 62: 191-217.
- Mouritsen OG, Bloom M. Models of lipid-protein interactions in membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1993; 22:145-71
- Mulligan R.C. The basic science of gene therapy. *Science,* 1993; 260: 926-932.
- Murase, K., T. Fujiwara, Y. Umemura, K. Suzuki, R. Iino, h. Yamashita, M. Saito, H. Murakoshi, K. Ritchie and A. Kusumi. Ultrafine membrane compartments for molecular diffusion as revealed by single molecule techniques. *Biophys. J.* 2004; 86: 4075-4093.
- Nabel E.G., Gordon D., Yang Z.H., Xu L., San H., Plautz G.E., y cols. Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes: lack of autoimmunity and gonadal localization. *Hum. Gene Ther.* 1992; 3: 649-656.

- Nagle JF. Long tail kinetics in biophysics? *Biophys. J.* 1992; 63:366–70.
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1982;1:841-849.
- Nikcevic G, Kovacevic-Grujicic N, Stevanovic M. Improved transfection efficiency of cultured human cells. *Cell Biol Int.* 2003;27(9):735-7
- Ober, R. J., S. Ram and E. S. Ward. Localization accuracy in single-molecule microscopy. *Biophys. J.* 2004; 86: 1185-1200.
- O'Mahoney JV, Brandon MR, Adams TE. Identification of a liver-specific promoter for the ovine growth hormone receptor. *Mol Cell Endocrinol.* 1994;101:129-139.
- Ottersen OP, Storm-Mathinsen J and Somogyi P Colocalization of glycine-like and GABA-like immunoreactivities in Golgi cell terminals in the rat cerebellum: a postembedding light and electron microscopic study. *Brain Res.* 1988; 450: 342-353.
- Otto E., Jones-Trower A., Vanin E.F., Stambaugh K., Mueller S.N. Characterization of a replication-competent retrovirus resulting from recombination of packaging and vectors sequences. *Hum. Gene Ther.* 1994; 5: 567-575
- Pagano A, Rovelli G, Mosbacher J, Lohmann T, Duthey B, Stauffer D, Risting D, Schuler V, Meigel I, Lampert C, Stein T, Prézeau L, Blahos J, Pin JP, Froestl W, Kuhn R, Heid J, Kaupmann K, Bettler B. C-Terminal interaction is essential for surface trafficking but not for heteromeric assembly of GABAB receptors. *J Neurosci.* 2001; 21(4):1189-1202.
- Paradis, H., Gaudreau, P., Massie, B., Lamarche, N., Guilbeault, C., Gravel, S., and Langelier, Y. Affinity purification of active subunit 1 of herpes simplex virus type 1 ribonucleotide reductase exhibiting a protein kinase activity. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 9647-9651.
- Pari G.S. and W.A. Keown, Experimental strategies in efficient transfection of mammalian cells: calcium phosphate and DEAE-dextran. *Methods Mol Biol.* 1997; 62: 301–316.

- Perán M, Hicks BW, Peterson NL, Hooper HT, Salas, R. Lateral mobility and anchoring of recombinant GABAA receptors depend on subunit composition. *Cell Mot Cyt.* 2001; 50:89-100.
- Perán M, Hooper HT, Rayner SH, Stephenson FA, Salas R. Subunit specificity in anchoring of recombinant GABAA receptors. *Neurosci Letters.* 2004.; 364:67-70.
- Phillips WD, Noakes PG, Roberds SL, Campbell KPM and Merlie JP Clustering and immobilisation of acetylcholine receptors by the 43-kD protein: a possible role for dystrophin-related protein. *J. Cell. Biol.* 1993; 123: 729-740.
- Pina, M. and Green, M. Biochemical studies on adenovirus multiplication. XIV. Macromolecule and enzyme synthesis in cells replicating oncogenic and non-oncogenic human adenovirus. *Virology.* 1969; 38: 573-586.
- Pralle, A., P. Keller, E. L. Florin, K. Simons and J. K. H. Horber. Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J. Cell Biol.* 2000; 148: 997-1007.
- Price, R. and Penmam, S. Transcription of the adenovirus genome by an amanitin sensitive RNA polymerase in HeLa cells . *J. of Virology.* 1972; 9: 621-626.
- Pritchett DB, Luddens H, Seeburg PH. Type I and type II GABAA-benzodiazepine receptors produced in transfected cells. *Science.* 1989a; 245:1389 –1392.
- Qian H, Sheetz MP, Elson EL. Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. *Biophys. J.* 1991; 60:910–21.
- Qing-Rong C., Dhruv K., Sanford A., James M. Liposomes complex to plasmids encoding angiostatin and endostatin inhibit breast cancer nude mice. *Cancer Res.* 1999; 59: 3308-3312
- Reits EAJ, Neefjes JJ. From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. *Nature Cell Biol.* 2001; 3(6):145-147.

- Ren Z, Riley NJ, Garcia EP, Sanders JM, Swanson GT, Marshall J. Multiple trafficking signals regulate kainate receptor KA2 subunit surface expresión. *J Neurosci.* 2003; 23(16):6608-16.
- Robertson PL .Advances in treatment of pediatric brain tumors. *NeuroRx.* 2006; 3(2):276-91.
- Rols MP, Coulet D, Teissie J. Highly efficient transfection of mammalian cells by electric field pulses. Application to large volumes of cell culture by using a flow system. *Eur J Biochem.* 1992;206:115-121.
- Saffman, P. G. and M. Delbruck. Brownian motion in biological membranes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1975; 72: 3111-3113.
- Salmons B., Gunzburg W.H. Targeting of retroviralvectors for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 1993; 4:129-141
- Samulski R.J. Adeno-associated virus: integration at specific chromosomal locus. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 1993; 3: 74-80.
- Saxton MJ. Lateral diffusion in a mixture of mobile and immobile particles: a Monte Carlo study. *Biophys. J.* 1990; 58:1303-6.
- Saxton, M.. Anomalous diffusion due to obstacles: a Monte Carlo study. *Biophys. J.* 1994; 66: 394-401.
- Saxton, M. J. Lateral diffusion in an archipelago. Single-particle diffusion. *Biophys. J.* 1993; 64: 1766-1780.
- Saxton, M. J.. Single-particle tracking: the distribution of diffusion coefficients. *Biophys. J.* 1997; 72: 1744-1753.
- Saxton, M. J. and K. Jacobson. Single -particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annu. rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1997; 26: 373-399.
- Schiedner, G., Hertel, S. and Kochanek, S. Efficient transformation of primary human amniocytes by E1 functions of ad5: generation of new cell lines for adenoviral vector production [In Process Citation], *Hum Gene Ther.* 2000; 11: 2105-2116.
- Schowalter, D. B., Himeda, C. L., Winther, B. L., Wilson, C. B. and Kay, M. A. Implication of interfering antibody formation and apoptosis as two different mechanisms leading to variable duration of adenovirus-

- mediated transgene expression in immune-competent mice. *J Virol.* 1999; 73: 4755-4766.
- Schütz, G. J., G. Kada, V. P. Pastushenko and H. Schindler. Properties of lipid microdomains in muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *EMBO J.* 2000; 19: 892-901.
 - Scott DB, Blanpied TA, Swanson GT, Zhang C, Ehlers MD. An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *J Neurosci.* 2001; 21(9):3063-3072.
 - Sergé A, Fourgeaud L, Hémar A, Choquet D. Receptor activation and homer differentially control the lateral mobility of metabotropic glutamate receptor 5 in the neuronal membrane. *J Neurosci.* 2002; 22(10):3910-3920.
 - Sheets ED, Simson R, Jacobson K. New insights into membrane dynamics from the analysis of cell surface interactions by physical methods. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1995; 7:707-14
 - Sheetz MP. Glycoprotein motility and dynamic domains in fluid plasma membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1993; 22:417-31
 - Sheng M Glutamate receptors put in their place. *Nature.* 1997; 386: 221-223.
 - Shinoura N., Sakurai S., Asai A., Kirino T., Hamada H. Transduction of a fiber-mutant adenovirus for the *HSVtk* gene highly augments the cytopathic effect towards gliomas. *Jap. J. Cancer Res.* 2000; 91(10): 1028-1034.
 - Sigel E, Baur R, Trube G, Mohler H, Malherbe P. The effect of subunit composition of rat brain GABAA receptors on channel function. *Neuron.* 1990; 5:703-711.
 - Skotzko M., Wu L., Anderson W.F., Gordon E.M., Hall F.L. Retroviral Vector-mediated gene transfer of antisense cyclin G1 (GYCG1) inhibits proliferation of human osteogenic sarcoma cells. *Cancer Res.* 1995; 55: 5493-5498
 - Smith A.E. Viral vector in gene therapy. *Annu. Rev. Microbiol.* 1995; 49: 807-838

- Smith J.G., R.L. Walzem and J.B. German, Liposomes as agents of DNA transfer. *Biochim Biophys Acta*. 1993; 1154:327–340.
- Smith, G. M. Adenovirus-mediated gene transfer to treat neurologic disease, *Arch Neurol*. 1998; 55: 1061-1064.
- Snyder R.O., Miao C.H., Patijn G.A., Spratt S.K., Danos O., Nagy D., y cols. Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors. *Nature Genet*. 1997; 16(3): 270-276.
- Sonabend AM, Ulasov IV, Lesniak MS. Conditionally replicative adenoviral vectors for malignant glioma. *Rev Med Virol*. 2006 ;16(2):99-115.
- Stewart M.J., Plautz G.E., Buono L.D., Yang Z.Y., Xu L., Gao X., y cols. Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes: safety and acute toxicity in mice. *Hum. Gene Ther.*, 1992; 3:267-275.
- Stratford-Perricaudet L.D., Levero M., Chase J.F., Perricaudet M., Briand P. Evaluation of the transfer and expression in mice of an enzyme-encoding gene using a human adenovirus vector. *Hum. Gene Ther*. 1990; 1: 241-256.
- Straubinger RM, Papahadjopoulos D. Liposomes as carriers for intracellular delivery of nucleic acids. *Methods Enzymol*. 1983;101:512-527.
- Tardin C, Cognet L, Bats C, Lounis B, Choquet D. Direct imaging of lateral movements of AMPA receptors inside synapses. *EMBO J*. 2003; 22:4656–4665.
- Thomas J, Webb WW. Fluorescence photobleaching recovery: a probe of membrane dynamics. *Physics J*. 1990 38:129–52.
- Thompson SA, Whiting PJ, Wafford KA. Barbiturate interactions at the human GABAA receptor: dependence on receptor subunit combination. *Br J Pharmacol*. 1996b; 117:521–527.
- Tischlis P.N., Lazo P.A. Virus-host interactions and patogénesis of murine and human oncogenic retrovirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 1991; 171: 95-171

- Tiwari SB, Amiji MM. A review of nanocarrier-based CNS delivery systems. *Curr Drug Deliv.* 2006;3(2):219-32.
- van der Wouden EA, Sandovici M, Henning RH, de Zeeuw D, Deelman LE. Approaches and methods in gene therapy for kidney disease. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2004;50(1):13-24.
- Velazquez JL, Thompson CL, Barnes EM and Angelides KJ Distribution and Lateral Mobility of GABA/Benzodiazepine Receptors on Nerve Cells. *J. Neurosci.* 1989; 9: 2163-2169.
- Villemure JF, Adam L., Bevan NJ, Gearing K, Chénier S, Bouvier M. Sub-celular distribution of GABAB receptors homo- and heterodimers. *Biochem J.* 2005; 388:47-55.
- Vrljic, M., S. Y. Nishinura, S. Brasselet, W. E. Moerner and H. M. McConnell. Translational Diffusion of Individual Class II MHC Membrane Proteins in Cells. *Biophys. J.* 2002; 83: 2681-2692.
- Wafford KA, Whiting PJ, Kemp JA. Differences in affinity and efficacy of benzodiazepine receptor ligands at recombinant gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Mol Pharmacol.* 1993; 43:240 –244.
- Wang H, Bedford FK, Brandon NJ, Moss SJ and Olsen RW. GABA_A-receptor-associated protein links GABA_A receptors and the cytoskeleton. *Nature.* 1999; 397: 69-72.
- Webb WW, Barak LS, Tank DW, Wu ES. Molecular mobility on the cell surface. *Biochem. Soc. Symp.* 1981; 46:191–205.
- Weiskirchen R, Kneifel J, Weiskirchen S, van de Leur E, Kunz D and Gressner AM. Comparative evaluation of gene delivery devices in primary cultures of rat hepatic stellate cells and rat myofibroblasts. *BMC Cell Biology.* 2000; 1(4)
- Weissman S.M. Gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992; 89: 11.111-11.112.
- Wenthold RJ, Sans N, Standley S, Prybylowski K, Petralia RS. Early events in the trafficking of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors *Biochem Soc Trans.* 2003;31(4):885-8.

- Whiting PJ, McAllister G, Vassilatis D, Bonnert TP, Heavens RP, Smith DW, Hewson L, O'Donnell R, Rigby MR, Sirinathsinghji, DJ, Marshall G, Thompson SA, Wafford KA, Vasilatis D. Neuronally restricted RNA splicing regulates the expression of a novel GABA_A receptor subunit conferring atypical functional properties *J Neurosci.* 1997; 17:5027–5037.
- Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, Nemerow GR. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell.* 1993;73(2):309-19.
- Winckler B, Poo MM. No diffusion barrier at axon hillock. *Nature.* 1996; 18: 213.
- Wong TK, Neumann E. Electric field mediated gene transfer. *Biochem. Biophys Res Commun* 1982;107:584-587.
- Wulff P. and Wisden W. Dissecting neural circuitry by combining genetics and pharmacology. *Trends Neurosci.* 2005; 28, 44-50.
- Xu M., Kumar D., Srinivas S., Detolla L.J., Yu S.F., Stass S.A. Parenteral gene therapy with p53 inhibits human breast tumors in vivo through a bystander mechanism without evidence of toxicity. *Hum. Gene Ther.* 1997; 8: 177-185
- Yamada, M., Lewis, J. A. and Grodzicker, T. Overproduction of the protein product of a nonselected foreign gene carried by an adenovirus vector, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985; 82: 3567-3571.
- Yang Y., Ertl H.C., Wilson J.M. MHC class 1-restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses. *Immunity.* 1994a; 1: 433-442.
- Yang Y., Nunes F.A., Berencsi K., Furth E.E., Gonczol E., Engelhardt J.E. Inactivation of E2a in recombinant adenoviruses improves the prospect for gene therapy for cystic fibrosis. *Nat. Genet.* 1994c; 7: 362-369.
- Yang Y., Nunes F.A., Berencsi K., Furth E.E., Gonczol E., Wilson J.M. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994b; 91: 4407-4411.

-
- Yang, Y., Nunes, F. A., Berencsi, K., Gonczol, E., Engelhardt, J. F. and Wilson, J. M. Inactivation of E2a in recombinant adenoviruses improves the prospect for gene therapy in cystic fibrosis, *Nat Genet.* 1994; 7: 362-369.
 - Yi JY, Han I, Oh ES. Transmembrane domain-dependent functional oligomerization of syndecans. *ScientificWorldJournal.* 2006; 6:457-9
 - Zabner J., Petersen D.N., Puga A.P., Graham S.M., Couture L.A. Safety and efficacy of repetitive adenovirus-mediated transfer of CFTR cDNA to airway epithelia of primates and cotton rats. *Nat. Genet.* 1994; 6: 75-83.
 - Zerangue N, Schwappach B, Jan YN, Jan LY. A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron.* 1999;22(3):537-48.
 - Zhang F, Lee GM, Jacobson K. Protein lateral mobility as a reflection of membrane microstructure. *BioEssays.* 1993; 15:579-88

ANEXO