Universidad de Málaga
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular y Bioquímica

GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MODELOS MURINOS TRANSGÉNICOS PARA EL ANÁLISIS FUNCIONAL DE GLUTAMINASAS CEREBRALES

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Biotecnología Avanzada

Ana Peñalver Alonso

Directores:

Javier Márquez Gómez
Francisco J. Alonso Carrión

Málaga, 2016

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

AUTOR: Ana Peñalver Alonso

http://orcid.org/0000-0002-5799-6780

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga

Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode
Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.
No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica

MIGUEL ÁNGEL MEDINA TORRES, Director del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga,

ACREDITA QUE: la Tesis Doctoral titulada: "GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MODELOS MURINOS TRANSGÉNICOS PARA EL ANÁLISIS FUNCIONAL DE GLUTAMINASAS CEREBRALES", que presenta Dña. ANA PEÑALVER ALONSO para optar al título de Doctor en Ciencias, ha sido realizada bajo la dirección de los doctores D. Javier Márquez Gómez, Catedrático de Universidad, y D. Francisco J. Alonso Carrión, Catedrático de Universidad, ambos del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente en Málaga a 20 de Junio de 2016.

Fdo.: Miguel Ángel Medina Torres

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

JAVIER MÁRQUEZ GÓMEZ, Catedrático de Universidad del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga y

FRANCISCO JOSÉ ALONSO CARRIÓN, Catedrático de Universidad del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga,

CERTIFICAN que Dña. ANA PEÑALVER ALONSO, Licenciada en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos recogidos en la presente Memoria para optar al Grado de Doctor en Ciencias por la Universidad de Málaga. Así mismo, el profesor J. Márquez ha sido el tutor de la doctoranda durante toda su etapa predoctoral.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente en Málaga a 20 de Junio de 2016.

Fdo. Javier Márquez Gómez
Catedrático Bioquímica y Biol. Molecular

Fdo. Francisco J. Alonso Carrión
Catedrático Bioquímica y Biol. Molecular

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Este trabajo ha sido subvencionado por el proyecto de excelencia CVI-6656 de la Consejería Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía, por el proyecto RD12/0028/0013 de la red de trastornos adictivos (RTA, programa RETICS, Instituto de Salud Carlos III) y por el proyecto SAF2015-64501-R del Ministerio de Economía y Competitividad. La Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía) concedió una beca predoctoral del Plan de Formación de Investigadores, de cuatro años de duración (2013-2016), a la investigadora Dña. Ana Peñalver Alonso. Parte de los resultados y metodologías recogidas en la presente Memoria han dado lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones:

- PEÑALVER, A., Campos-Sandoval, J.A., Blanco, E., Cardona, C., Castilla, L., Martín-Rufián, M., Estivill-Torrús, G., Sánchez-Varo, R., Alonso, F.J., Pérez-Hernández, M., Colado, M.I., Gutiérrez, A., Rodríguez de Fonseca, F., Márquez, J. **maLPA1 receptor knockout mice have strong deficits on brain glutaminase (KGA) and MMP-9 enzymes with altered hippocampal dendritic spine morphology of glutamatergic pyramidal cells** (en revisión en *Journal of Neurochemistry*).

- Márquez, J., Campos-Sandoval, J.A., PEÑALVER, A., Matés, J.M., Segura, J.A., Alonso, F.J., Rodríguez de Fonseca, F. **Brain glutaminases and drug addiction** (en revisión en *Neurochemical Research*).

- Márquez, J., Cardona, C., Martín-Rufián, M., Lobo, C., PEÑALVER, A., Campos-Sandoval, J.A. **Glutaminases in brain: multiple isoforms for many purposes.** *Neurochemistry International* 8:1-5 (2015).

- PEÑALVER, A., Tosina, M., Martín-Rufián, M., Campos-Sandoval, J.A., Alonso, F.J., Segura, J.A., Matés, J.M., Ramírez, M.A., Gutiérrez-Adán, A., Márquez, J. **Design and generation of a glutaminase GLS2 conditional knockout mice.** *Transgenic Research* 23(5):901-902 (2014).

- Márquez, J., Cardona, C., Campos-Sandoval, J.A., PEÑALVER, A., Tosina, M., Matés, J.M., Martín-Rufián, M. **Mammalian glutaminase isozymes in brain.** *Metab. Brain Dis.* 28: 133-137 (2013).

- PEÑALVER, A., Tosina, M., Martín-Rufián, M., Campos-Sandoval, J.A., Segura, J.A., Matés, J.M., Ramírez, M.A., Alonso, F.J., Gutiérrez-Adán, A., Márquez, J. Design and generation of a glutaminase Gls2 conditional knockout mice. Presentación oral en el Congreso conjunto Red RETICS de Trastornos Adictivos RTA-SENC. Granada (2015).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

- PEÑALVER, A., Campos-Sandoval, J.A., SánchezVaro, R., Cardona, C., Castilla, L., Blanco, E., Martín-Rufián, M., Segura, J.A., Matés, J.M., Alonso, F.J., Gutiérrez, A., Rodríguez de Fonseca, F., Márquez, J. **LPA_1 receptor knockout mice show strong deficit on glutamate biosynthetic enzyme glutaminase (GLS, KGA) and altered morphology of hippocampal and cortical dendritic spines.** *Póster en el Congreso conjunto Red RETICS de Trastornos Adictivos RTA-SENC*. Granada (2015).

- PEÑALVER, A., Tosina, M., Martín-Rufián, M., Campos-Sandoval, J.A., Alonso, F.J., Segura, J.A., Matés, J.M., Ramírez, M.A., Gutiérrez-Adán, A., Márquez, J. **Diseño y generación de dos modelos knock out condicionales de glutaminasa *Gls2* y su implicación en procesos de adicción**. *Presentación oral en el Congreso conjunto Red RETICS de Trastornos Adictivos RTA-SENC*. Oviedo (2013).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

JAVIER MÁRQUEZ GÓMEZ, Catedrático de Universidad del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga y

FRANCISCO JOSÉ ALONSO CARRIÓN, Catedrático de Universidad del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga,

AUTORIZAN a Dña. ANA PEÑALVER ALONSO a la lectura y defensa de esta memoria de Tesis Doctoral.

Así mismo, los co-directores de la Tesis certifican que todas las publicaciones (y comunicaciones a Congresos) que avalan la presente memoria de Tesis Doctoral no han sido utilizadas en tesis anteriores y han sido generadas, parcial o totalmente, a partir de resultados y metodologías desarrollados durante la realización de la Tesis Doctoral de Dña. Ana Peñalver Alonso.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente en Málaga a 20 de Junio de 2016.

Fdo. Javier Márquez Gómez
Catedrático Bioquímica y Biol. Molecular
Tutor y Director de la Tesis

Fdo. Francisco J. Alonso Carrión
Catedrático Bioquímica y Biol. Molecular

Co-director de la Tesis

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ABREVIATURAS

Abs: Absorbancia

AC: Adenilato ciclasa

AMP: Adenosina 5'-monofosfato

AMPc: AMP cíclico

AMPA: Receptor del ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

ATP: adenosín 5'-trifosfato

ATX: Autotaxina

BBB: Barrera hematoencefálica

BDNF: *Brain-derived neurotrophic factor;* factor neurotrófico derivado de cerebro

BSA: Albúmina de suero bovino

Cas9: *CRISPR-associated protein-9 nuclease*

cDNA: DNA complementario

Cre: *Cyclization recombinase*

CRISPR: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

Ct: *Cycle threshold;* ciclo umbral

Cx: Corteza

DA: Dopamina

dCTP: 2'-desoxicitidina 5'-trifosfato

DG: *Dentate gyrus;* giro dentado

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: 2'-desoxinucleósido 5' trifosfato

DO: Densidad óptica

dpc: Días *post coitum*

ES: *Embryonic stem cell*; célula madre embrionaria

FBS: Suero fetal bovino

Flp: Recombinasa Flipasa

FRT: *Flippase recognition target;* sitio de reconocimiento por flipasa

Fw: Cebador oligonucleotídico sentido

G: capa granular del cerebelo

G418: geneticina

GA: Glutaminasa

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

GAB: Transcrito e isoenzima GA larga codificada por el gen *GLS2/Gls2*

GABA: Ácido ϒ-aminobutírico

GAC: Transcrito e isoenzima GA corta codificada por el gen *GLS/Gls*

GFP: *Green fluorescent protein;* proteína verde fluorescente

GIP: *Glutaminase Interacting Protein;* proteína que interactúa con glutaminasa

Gln: Glutamina

Gls2$^{tm1a/+}$: Ratones heterocigotos para el alelo tm1a

Gls2$^{tm1a/tm1a}$: Ratones homocigotos para el alelo tm1a

Gls2$^{tm1c/+}$: Ratones heterocigotos para el alelo tm1c

Gls2$^{tm1c/tm1c}$: Ratones homocigotos para el alelo tm1c

GPCRs: Receptores acoplados a proteínas G

GS: Glutamina sintetasa

h: *hilus;* hilo

hCG: *Human chorionic gonadotropin;* gonadotropina coriónica humana

HRP: *Horseradish peroxidase;* peroxidasa de rábano

HSP: *Heat shock protein;* proteína de choque térmico

HT: Heterocigoto

ICM: *Inner cell mass*; masa celular interna del blastocisto

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1

IP3Rs: Receptores inositol trifosfato

kb: Kilopares de bases

KGA: Transcrito e isoenzima GA larga codificada por el gen *GLS/Gls*

KO: *Knockout*

KOLPA$_1$: *Knockout* para el receptor LPA$_1$

Glu: Glutamato

LGA: Transcrito e isoenzima GA corta codificada por el gen *GLS2/Gls2*

LH: Hormona luteinizante

LIF: *Leukemia inhibitory factor;* factor inhibidor de la leucemia

LoxP: *Locus of crossing over in P1;* sitios de reconocimiento para la recombinasa Cre

LPA: Ácido lisofosfatídico

LPA$_1$: Receptor del ácido lisofosfatídico tipo 1

LPs: Lisofosfolípidos

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

LRPCR: *Long Range PCR*

LSD: Diferencia mínima significativa de Fisher

LTP: Potenciación a largo plazo

m: Capa molecular

M: Capa molecular del cerebelo

M2: Medio de mantenimiento y lavado

maLPA$_1$: Variante Málaga de ratones LPA$_1$

MEF: *Murine embryonic fibroblast;* fibroblasto embrionario murino

mGluR: Receptores metabotrópicos de glutamato

min: Minutos

MMI: Membrana mitocondrial interna

MMP: Metaloproteinasa de matriz extracelular

mRNA: RNA mensajero

NAc: Núcleo accumbens

NGF: *Nerve growth factor;* factor de crecimiento nervioso

NMDA: Receptor N-metil-D-aspartato

NPC: *Neural progenitor cell;* células progenitoras neurales

O/N: *Overnight* ; toda la noche

P: Capa de Purkinje

pA: Poliadenilación

pb: Pares de bases

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PFC: *Prefrontal cortex;* corteza prefrontal

Pi: Fosfato inorgánico

PI3K: Fosfatidilinositol 3 kinasa

PLA2: Fosfolipasa A2

PLC: Fosfolipasa C

PLD: Fosfolipasa D

PMSG: *Pregnant mare serum gonadotropin;* gonadrotopina sérica de yegua gestante

RNA: Ácido ribonucleico

RT-PCR: Transcripción inversa seguida de PCR

RT: *Room temperature;* temperatura ambiente

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Rv: Cebador oligonucleotídico antisentido

s: segundos

SDS: Dodecil sulfato sódico

SEM: Desviación estándar de la media

slm: *stratum lacunosum-moleculare;* estrato lacunoso-molecular

SNC: Sistema nervioso central

SNT: Alfa-1 sintrofina

Sp: *stratum pyramidale;* estrato piramidal

SP-1: Esfingosina 1-fosfato

St: *Striatum;* estriado

SV40: *Simian Virus 40;* virus del simio 40

TIMP1: *Tissue inhibitor of metalloproteinases 1;* inhibidor tisular de MMP tipo 1

tm1a: Alelo que ha integrado la *cassette* transgénica

tm1c: Alelo donde la *cassette* transgénica ha sido eliminada por acción de la recombinasa Flp

tPA: Activador tisular del plasminógeno

TSS: *Transcription start site*; sitio de inicio de la transcripción

U: Unidades Internacionales de actividad enzimática

UI: Unidades Internacionales de hCG o PMSG (UI/l)

UTR: Región no traducida

VS: Vaso sanguíneo

VTA: Área tegmental ventral

WT: Cepa o animales *Wild type;* cepa o animales silvestres

3V: Tercer ventrículo

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

ÍNDICE

Introducción

1. Análisis funcional de genes con modelos murinos transgénicos 3
2. Glutaminasa de mamíferos: genes y transcritos 7
   - 2.1 Gen *GLS* humano 9
   - 2.2 Gen *GLS2* humano 11
   - 2.3 Diferencias moleculares y cinéticas entre isoenzimas GLS y GLS2 12
   - 2.4 Proteínas que interaccionan con isoenzimas GA 14
   - 2.5 Glutaminasa en cerebro 18
   - 2.6 Neurotransmisión glutamatérgica en la adicción a drogas 22
3. Ácido lisofosfatídico (LPA) 24
   - 3.1 Síntesis y mecanismo de acción 24
   - 3.2 Expresión de LPA_1 en cerebro de mamíferos 26
   - 3.3 Modelos murinos transgénicos del receptor LPA_1 28
   - 3.4 Modelo transgénico murino KO maLPA_1 y adicción 29
   - 3.5 Modelo transgénico murino KO maLPA1 y neurogénesis 30

Objetivos 33

Materiales y Métodos

MATERIALES

1. Vector de transgénesis 38
2. Cepas de *Escherichia coli* 40
3. Líneas celulares de mamíferos 41
4. Animales de experimentación 41

MÉTODOS

METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE ANIMALES KO Gls2

1. Validación del vector de transgénesis 43
   - 1.1 Obtención de células competentes 43
   - 1.2 Transformación de bacterias DH5α 43
   - 1.3 Aislamiento de DNA plasmídico 44
   - 1.4 Análisis de restricción del vector de transgénesis 44
   - 1.5 Secuenciación del vector de transgénesis 44
2. Co-cultivo de células ES y MEF 45
   - 2.1 Cultivo de fibroblastos embrionarios murinos inactivados 45
   - 2.2 Cultivo de células ES murinas 46

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3. Electroporación de células ES murinas con el vector de transgénesis 46
3.1 Digestión enzimática del DNA plasmídico 46
3.2 Electroporación de las células ES murinas con el vector de transgénesis 47
4. Selección y genotipado de las células ES murinas transgénicas 48
4.1 Selección con geneticina (G418) 48
4.2 Genotipado de las células ES murinas transgénicas 48
5. Microinyección de células ES murinas transgénicas en embriones en estadio de 8 células 55
5.1 Superovulación de ratones Swiss 55
5.2 Obtención de embriones de ratones Swiss 56
5.3 Microinyección de las células ES murinas transgénicas 56
6. Transferencia de los embriones microinyectados con células ES transgénicas a ratones 57
7. Genotipado de ratones 58
8. Análisis de viabilidad de los ratones homocigotos *Gls2*$^{tm1a/tm1a}$ 59
9. Cruce de la colonia *Gls2*$^{tm1a/+}$ generada con animales que expresan la Flp recombinasa 60
10. Cruce de la colonia *Gls2*$^{tm1c/tm1c}$ con animales que expresan la Cre recombinasa 61
ANÁLISIS FENOTÍPICO MOLECULAR DE MODELOS MURINOS TRANSGÉNICOS
1. Análisis de los transcritos GA mediante qRT-PCR 62
1.1 Cuantificación de los transcritos GLS2 en animales WT,*Gls2*$^{tm1a/+}$ y *Gls2*$^{tm1c/+}$ 62
1.2 Cuantificación del transcrito KGA en animales KOLPA$_1$ 63
2. Análisis de expresión proteica por inmunotransferencia Western 64
2.1 Extracción y cuantificación de proteínas 64
2.2 Inmunotransferencia Western 66
3. Análisis de expresión de isoenzimas GA mediante cuantificación de la actividad enzimática 67
4. Inmunohistoquímica de isoformas GA en animales KOLPA$_1$ 68
5. Caracterización de la morfología de espinas dendríticas en ratones KOLPA$_1$ 69
6. Análisis por zimografía en gel para la determinación de la actividad enzimática 70
6.1 Determinación de la actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9 70
6.2 Determinación de la actividad proteolítica del activador tisular del plasminógeno 71

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Resultados y Discusión

PARTE I: GENERACIÓN DE UN MODELO MURINO KO CONDICIONAL PARA Gls2

1. Validación del vector de transgénesis 75
2. Cultivo de las células madre embrionarias murinas 77
3. Electroporación de células ES murinas con el vector de transgénesis 79
4. Selección y genotipado de células ES murinas transgénicas 79
   4.1 Genotipado por *Long-Range* PCR (LRPCR o *long*-PCR) de células ES murinas transgénicas 81
   4.2 Genotipado de las células ES murinas transgénicas mediante transferencia Southern 83
5. Microinyección de células ES murinas transgénicas en embriones en estadio de 8 células 84
6. Genotipado de ratones transgénicos 86
7. Análisis de viabilidad de ratones homocigotos *Gls2*$^{tm1a/tm1a}$ 87
8. Cruces de la colonia *Gls2*$^{tm1a/+}$ generada con animales que expresan la Flp recombinasa 89
9. Análisis fenotípico molecular de los animales heterocigotos *Gls2*$^{tm1a/+}$ 92
   9.1 Análisis de expresión de isoenzimas GA en animales WT, *Gls2*$^{tm1a/+}$ y *Gls2*$^{tm1c/+}$ mediante qRT-PCR 92
   9.2 Análisis de expresión de isoenzimas GA en animales WT, *Gls2*$^{tm1a/+}$ y *Gls2*$^{tm1c/+}$ mediante inmunotransferencias Western 95
   9.3 Análisis de expresión de isoenzimas GA en colonias WT, *Gls2*$^{tm1a/+}$ y *Gls2*$^{tm1c/+}$ mediante cuantificación de la actividad GA 96
10. Cruce de la colonia *Gls2*$^{tm1c/tm1c}$ con animales que expresan la Cre recombinasa 99

PARTE II: CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ISOENZIMAS GA EN EL MODELO MURINO KOLPA$_1$

1. Inmunohistoquímica de isoformas GA en animales KOLPA$_1$ 100
2. Evaluación de los niveles de proteína KGA mediante inmunotransferencia Western en animales KOLPA$_1$ 104
3. Cuantificación del transcrito KGA en regiones cerebrales de animales KOLPA$_1$ 105
4. Evaluación de la actividad enzimática glutaminasa en animales KOLPA$_1$ 106
5. Caracterización de la morfología de espinas dendríticas en ratones KOLPA$_1$ 109
6. Análisis de la expresión de marcadores proteicos de espinas dendríticas 112
7. El silenciamiento génico de LPA$_1$ reduce la expresión y actividad gelatinasa

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

MMP-9, pero no la MMP-2 113
8. Función de las isoenzimas GA en el desarrollo y la diferenciación neuronal 119
Conclusiones 121
Anexos 125
Bibliografía 141

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Introducción

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Análisis funcional de genes con modelos murinos transgénicos

La secuenciación del genoma humano ha dado lugar a la generación de nuevas preguntas como cuál es la función que se deriva de cada gen, cuáles son las proteínas que expresan y cómo ejercen sus posibles interacciones. De los más de 20.000 genes humanos identificados hasta la fecha, aún se desconoce la función de aproximadamente dos terceras partes. Para aproximarnos al conocimiento de su función resulta muy útil trabajar con modelos animales. Dado que las especies *Homo sapiens* y *Mus musculus* comparten casi el 100% de los genes, y que su organización genómica y mecanismos de expresión están estrechamente relacionados, resulta evidente que los modelos murinos son especialmente idóneos para mimetizar la mayoría de los procesos biológicos (Capecchi, 1994) y para el estudio de la base genética de las enfermedades humanas. En este contexto, la caracterización fenotípica y molecular, empleando técnicas de Genómica Funcional y Proteómica de modelos murinos transgénicos deficientes o *knockout* (KO) de genes concretos, es una de las principales herramientas que permiten elucidar la función génica.

Ya en la década de los 70, Brinster obtuvo el primer ratón quimérico mediante la inyección en blastocistos de células de diferentes cepas, para posteriormente observar su contribución a la formación de los diferentes tejidos del animal durante el desarrollo (Brinster & Tenbroeck, 1969). En 1978, Jaenisch empleó por primera vez la microinyección en blastocistos murinos de vectores retrovirales derivados del virus SV40 (*Simian Virus* 40) (Jaenisch & Mintz, 1974). Dos años más tarde se acuñó por primera vez el término transgénico, cuando Gordon y Ruddle llevaron a cabo la primera microinyección de DNA en pronúcleos de óvulos fertilizados y comprobaron que dicha modificación se incorporaba a la línea germinal (Gordon *et al.*, 1980). En la actualidad, se entiende por animal transgénico aquel que ha adquirido en su línea germinal un DNA exógeno (sea propio o extraño) y que, por tanto, puede transmitirlo a su progenie. En 1986, Gossler demostró que las células madre embrionarias (ES, *embryonic stem cell*) podían utilizarse como vehículo de transgénesis, permitiendo además la selección de aquellas que presentaban modificaciones específicas incluso antes de ser microinyectadas en los blastocistos (Gossler *et al.,* 1986). En 1987, Capecchi logró

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

inactivar el gen de la hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (*Hprt*) empleando recombinación homóloga en células ES murinas (Thomas & Capecchi, 1987; Benavides & Guénet, 2003).

La importancia de los modelos murinos como base para la investigación de la función de genes *in vivo* y como modelos de enfermedades humanas, queda reflejada en el desarrollo de dos proyectos internacionales que pretenden conseguir en los próximos años una amplia representación de líneas ES murinas, vectores y ratones transgénicos. Uno de estos proyectos es norteamericano, el proyecto KOMP (*Knockout Mouse Project*), y el otro europeo, proyecto EUCOMM (*European Conditional Mouse Mutagenesis*). En julio de 2006 se inició el proyecto KOMP, como una iniciativa de los Institutos Nacionales de Salud Americanos (NIH) para generar una colección pública de células ES de la cepa C57BL/6 (la más comúnmente empleada en investigación) y ratones transgénicos con mutaciones nulas (KO) para todos y cada uno de los genes murinos (Skarnes *et al.,* 2011). El programa EUCOMM se inició en 2005 como alternativa complementaria al proyecto KOMP, reuniendo las iniciativas en este campo de diversos países europeos, con la participación de once grandes centros de Genómica Funcional de Alemania, Inglaterra, Francia e Italia. Pretende generar líneas de células ES murinas (cepa 129Sv), conteniendo mutaciones condicionales de al menos 20.000 genes. Una estrategia similar se puso en marcha en Canadá con el nombre de programa NORCOMM (Ringwald *et al.,* 2011).

Antes de que fuera posible transferir material génico a las células animales, la función de los genes se estudiaba observando los fenotipos particulares que resultaban al provocar mutaciones aleatorias mediante el empleo de radiaciones o sustancias químicas. Estas técnicas eran poco útiles y poco precisas para genomas diploides y, por ello, se han desarrollado otros métodos como: tecnología antisentido, ribozimas, RNAi, *etc*.

Cuando el objetivo concreto es modificar, reemplazar o destruir secuencias endógenas específicas con DNAs exógenos, se requiere llevar a cabo manipulaciones precisas y se emplean técnicas denominadas de *gene targeting*. Estas técnicas explotan el principio de la recombinación homóloga. La

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

recombinación homóloga es un proceso de intercambio génico que ocurre en todas las células y en la que intervienen dos moléculas de DNA con secuencias similares, aunque no necesariamente idénticas. No se requieren secuencias de DNA específicas pero, al menos en células animales, se necesita que éstas sean de gran longitud para que el intercambio génico sea eficiente (los denominados brazos de homología). La frecuencia de recombinación homóloga en células animales es generalmente muy baja, en comparación con la recombinación al azar (de 10^3 a 10^5 veces menor); por este motivo se requieren estrategias de selección complicadas para identificar las células que adquirieron el DNA exógeno correctamente (Melton, 2002).

Otro mecanismo de recombinación empleado en las técnicas de *gene targeting* (frecuentemente utilizadas en conjunción con la recombinación homóloga) es la recombinación lugar específica. Los diferentes organismos tienen sistemas propios de recombinación lugar específicos, pero pueden ser exportados a otros sistemas, como por ejemplo células animales, para el control preciso de los transgenes. Los sistemas de recombinación lugar específico más utilizados son: el sistema Cre/loxP y el Flp/FRT. La recombinasa Cre (*cyclization recombination*), que deriva del bacteriófago P1, escinde cualquier región de DNA localizada entre dos sitios loxP (*locus of crossing over in P1*). Por su parte, la recombinasa Flp (flipasa) se aisló de *Saccharomyces cerevisae*, y escinde igualmente el DNA flanqueado entre sus secuencias consenso FRT (Flp *recombinase target)*. Ambas secuencias, loxP y FRT, tienen una tamaño de 34 pb y están formadas por dos repeticiones invertidas de 13 pb flanqueantes y una zona central no palindrómica de 8 pb (Dymecki, 1996; Buchholz *et al.,* 1998). Estas secuencias suelen incorporarse en vectores de reemplazamiento, que explotan la recombinación homóloga, y se sitúan flanqueando exones o secuencias que pueden ser eliminadas de manera específica mediante el aporte exógeno de la recombinasa correspondiente. La utilización de estos vectores en células ES de ratón puede conducir a la obtención de animales transgénicos KO o KO condicionales (Austin *et al.*, 1981; Sternberg & Hamilton, 1981; Kwan, 2002; Hall *et al.,* 2009).

Recientemente, se ha implementado una nueva técnica para la obtención de animales transgénicos basada en el uso de proteasas guiadas por RNA; de éstas, la

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

más ampliamente utilizada es la llamada *Clustered Regularly Interpaced Short Palindromic Repeats-Crispr Associated genes 9* o abreviadamente CRISPR-Cas9 (Fig.1). Este método se basa en el sistema inmunitario utilizado por procariotas como mecanismo de defensa frente a virus infectivos exógenos. La técnica CRISPR-Cas9 aplicada a células ES murinas ha permitido obtener modelos animales de manera más rápida y eficiente que con los sistemas convencionales. (Ran *et al.,* 2013; Humphrey & Kasinski, 2015).

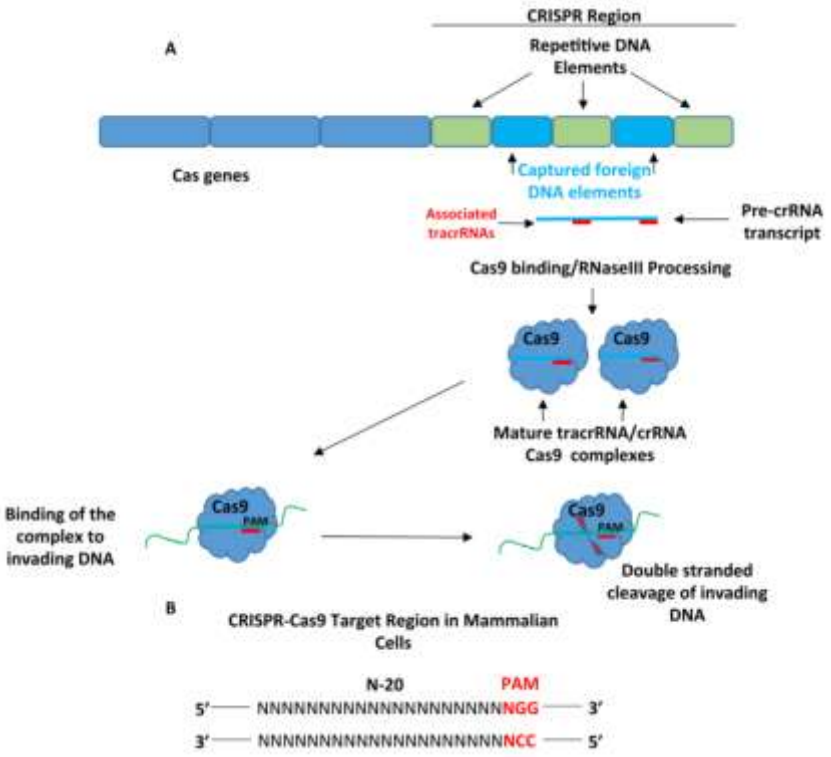


Figura 1. Sistema CRISPR-Cas descrito en *Streptococcus pyogenes*. En caso de infección por virus, el DNA exógeno es fragmentado e incorporado al locus CRISPR en medio de una serie de repeticiones cortas. Este *loci* se transcribe y procesa para generar RNAs de pequeño tamaño, denominados CRISPR RNA (crRNA), que se utilizan como guía para seleccionar las dianas que serán cortadas por las endonucleasas Cas. Estos crRNA se unen a un RNA parcialmente complementario: el CRIPSR RNA trans-activador (trRNA), cuya función es mantener el complejo crRNA-Cas en la región de reconocimiento. Este sistema se ha adaptado al campo de la biotecnología mediante la generación de RNAs sintéticos (guide RNA, gRNA), constituidos por la secuencia diana, el crRNA, el trRNA y la nucleasa Cas9. Cuando el gRNA se microinyecta en células ES murinas mediará un corte dirigido del DNA, permitiendo la generación de modificaciones precisas (Humphrey & Kasinski, 2015).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2. Glutaminasa de mamíferos: genes y transcritos

La glutamina (Gln) es uno de los aminoácidos libres más abundantes en el cuerpo humano, representando hasta un 25% del total de aminoácidos en plasma (Labow & Souba, 2000). Aunque se ha descrito principalmente como aminoácido no esencial, en determinadas situaciones de estrés, ejercicio extenuante, ciertas enfermedades, etc., donde los requerimientos del organismo superan su biosíntesis *de novo,* puede considerarse un aminoácido condicionalmente esencial (Lacey & Wilmore, 1990).

Entre el gran número de funciones que realiza la Gln en mamíferos (Fig.2), destaca su papel como transportador de amonio entre tejidos, reduciendo la toxicidad asociada a esta molécula y favoreciendo la homeostasis del nitrógeno (Souba, 1987). A partir del nitrógeno de su grupo amida se pueden sintetizar moléculas de diferente naturaleza, tales como nucleótidos, aminoácidos, aminoazúcares y proteínas. Su esqueleto carbonado sirve como fuente oxidable para aportar energía a las células en división. En neuronas, no sólo se utiliza como fuente de energía, sino también para la síntesis de neurotransmisores excitatorios e inhibitorios como el glutamato (Glu) y el ácido γ-aminobutírico (GABA), respectivamente (Walls *et al.,* 2014). En hígado, la Gln también es un sustrato del ciclo de la urea, implicada en la homeostasis del amonio y el bicarbonato (Häussinger *et al.,* 1992).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

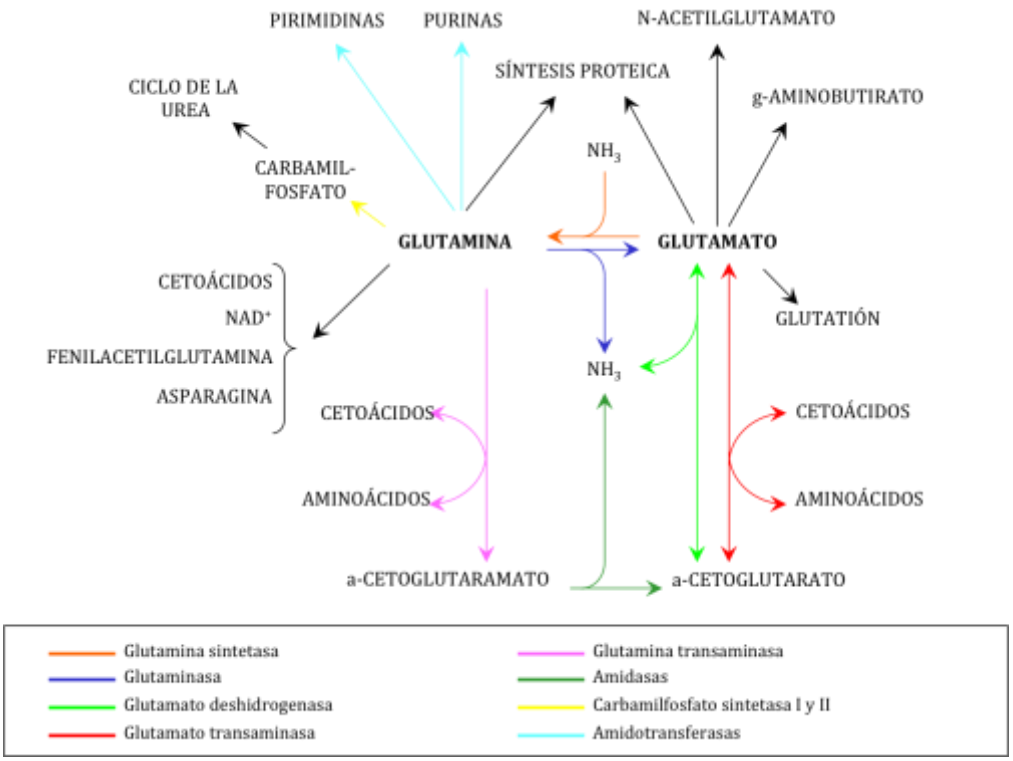


Figura 2. Participación de la Gln y el Glu en diferentes rutas metabólicas de mamíferos.

Aunque parte de la Gln es aportada por la dieta, la mayor parte proviene de la síntesis *de novo*, llevada a cabo por la reacción catalizada por la enzima glutamina sintetasa (GS; EC 6.3.1.2), la cual a partir de L-Glu, amonio y ATP genera L-Gln (Taylor & Curthoys, 2004). La principal enzima encargada del catabolismo de la Gln es la glutaminasa (GA; EC 3.5.1.2), una amidohidrolasa que, activada por fosfato inorgánico (Pi), cataliza la hidrólisis del grupo amida de la Gln, dando lugar a cantidades estequiométricas de L-Glu y amonio (Fig.3) (Krebs, 1935).

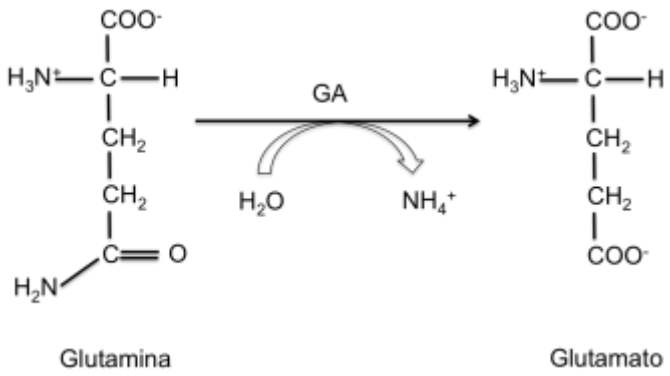


Figura 3. Reacción catalizada por la enzima glutaminasa. La enzima cataliza el primer paso de degradación de la Gln, generando cantidades estequiométricas de Glu y amonio.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

En humanos, la GA está codificada por dos genes diferentes denominados *GLS* y *GLS2* (Aledo *et al.,* 2000), genes parálogos surgidos por duplicación génica de un gen ancestral (Pérez-Gómez *et al.,* 2003). Del mismo modo, se han descrito genes ortólogos, *Gls* y *Gls2,* en rata y ratón (Pérez-Gómez *et al.,* 2003). Cabe destacar que proteínas parálogas, aún conservando un alto grado de similitud en su secuencia, pueden adquirir funciones diferentes durante la evolución (Márquez *et al.,* 2009).

Los genes *GLS* y *GLS2* codifican para dos isoenzimas. El gen *GLS*, localizado en humanos en el cromosoma 2, codifica para las isoenzimas tipo riñón o tipo K (*kidney*) denominadas KGA y GAC (Fig. 4); mientras que el gen *GLS2*, localizado en el cromosoma 12 humano, lo hace para las isoenzimas tipo hígado o tipo L (*liver*): GAB y LGA (Fig. 5) (Aledo et al., 2000; Márquez et al., 2010).

2.1 Gen *GLS* humano

El gen humano *GLS* tiene una longitud de 82 kb y el RNA mensajero (mRNA) transcrito del mismo está constituido por 19 exones. Como resultado del ayuste o corte y empalme alternativo (*alternative splicing)* del gen *GLS* surgen los transcritos: KGA, cuyo mRNA está formado por los exones del 1 al 14 y del 16 al 19, y el transcrito GAC, que posee exclusivamente los primeros 15 exones del gen y, por tanto, un extremo C-terminal diferente al de KGA (Fig. 4)(Elgadi *et al.,* 1999; Porter *et al.,* 2002).

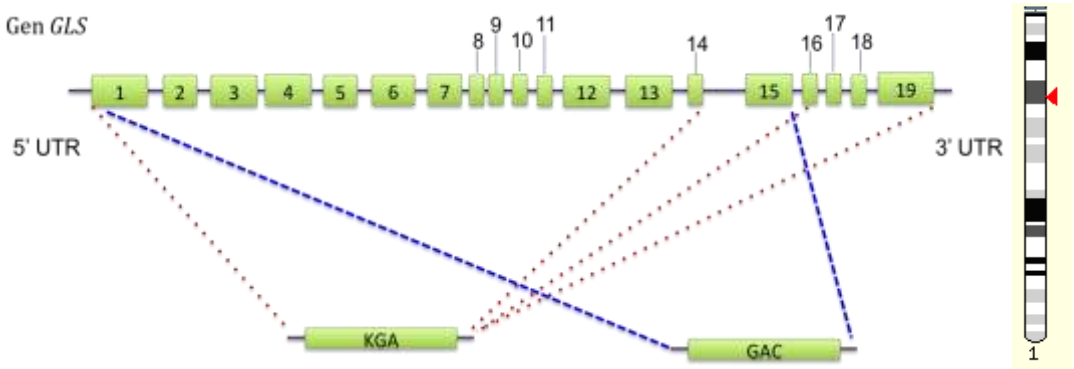


Figura 4. Gen *GLS* de glutaminasa humana y transcritos alternativos KGA y GAC. El gen *GLS* se encuentra localizado en el cromosoma 2 humano y codifica para los transcritos KGA y GAC (Aledo *et al.,* 2000). Este gen se encuentra en el cromosoma 1 murino, como se indica en la figura de la derecha.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

En cuanto a la expresión de cada uno de estos transcritos en tejidos humanos, cabe destacar que el mRNA de KGA, originalmente aislado de riñón, es ubicuo en todos los tejidos (Curthoys *et al.,* 1976; Kovacevic & McGivan, 1983), incluyendo al hígado fetal (Curthoys & Watford, 1995). El mRNA de GAC, aislado originalmente de células de cáncer de colon HT-29 (Elgadi *et al.,* 1999) y, posteriormente, también de riñón de rata y cerdo (Porter *et al.,* 2012), se expresa principalmente en músculo cardiaco, páncreas, placenta, riñón, pulmones y cerebro, y carece de expresión en hígado (Elgadi *et al.,* 1999; Szeliga *et al.*, 2008; Cardona *et al*., 2015).

Ambas isoformas GLS (KGA y GAC) presentan una regulación transcripcional en todos los tejidos, a excepción de la KGA de riñón que se induce particularmente en situaciones de acidosis metabólica. Esta regulación postranscripcional se lleva a cabo mediante la presencia en su estructura de elementos de respuesta a cambios en la concentración de protones (pH), situados en la región 3'-UTR del mRNA de la KGA (Laterza *et al.,* 2000; Porter *et al*., 2002). A esta secuencia se une la proteína ζ cristalina/NADPH-quinona reductasa lo que conduce a la estabilización de su mRNA y a un incremento del catabolismo renal de la Gln (Tang & Curthoys, 2001).

Aunque a nivel subcelular las isoenzimas GLS se identificaron inicialmente en la mitocondria (Curthoys & Weiss, 1974), la localización concreta en este orgánulo ha suscitado mucha controversia (Matés *et al.,* 2009). Para ilustrar estas discrepancias, cabría decir que prácticamente todas las posibles localizaciones submitocondriales han sido propuestas para las isoformas GLS, incluyendo la matriz mitocondrial (soluble) (Kalra & Brosnan, 1974), asociada a la cara interna de la membrana mitocondrial interna (MMI) (Shapiro *et al.,* 1991) y presencia simultánea en ambas monocapas de la MMI, existiendo dos poblaciones de GA: una asociada a la cara externa de la MMI y orientada hacia el espacio intermembranal, y otra asociada a la cara interna de la MMI y orientada hacia la matriz mitocondrial (Kvamme & Olsen, 1979). Resultados más recientes, sin embargo, han aportado evidencias experimentales convergentes a partir de estudios enzimáticos, inmunológicos y de modificación química que descartan su localización transmembrana y apoyan la idea de que la proteína se encuentra débilmente

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

asociada a la cara interna de la MMI, con su dominio funcional en la matriz mitocondrial y con una importante influencia del entorno lipídico en la regulación de su actividad enzimática (Aledo *et al.,* 1997; Matés *et al.,* 2009).

2.2 Gen *GLS2* humano

El gen *GLS2* tiene una longitud superior a 18 kb. El transcrito completo de mRNA de este gen está formado por 18 exones, y da lugar a dos variantes: GAB, transcrito canónico largo constituido por los exones del 1 al 18, y un transcrito corto, LGA, cuyo mRNA está constituido por los exones del 2 al 18, omitiendo el exón 1 (Aledo *et al.,* 2000; Pérez-Gómez *et al.,* 2003) (Fig. 5). La variante LGA presenta un sitio de inicio de la transcripción (TSS) alternativo, diferente al de GAB, localizado al final del intrón 1 del gen *GLS2* (a 7kb de distancia del promotor de la GAB en humanos). Cabe destacar que, aparte de la región promotora canónica del transcrito LGA, se ha identificado la presencia de otra posible región promotora distante de LGA situada a 1,5 kb del promotor GAB, que podría no ser funcional al presentar un alto nivel de metilación en islas CpG (Martín-Rufián *et al.*, 2012).

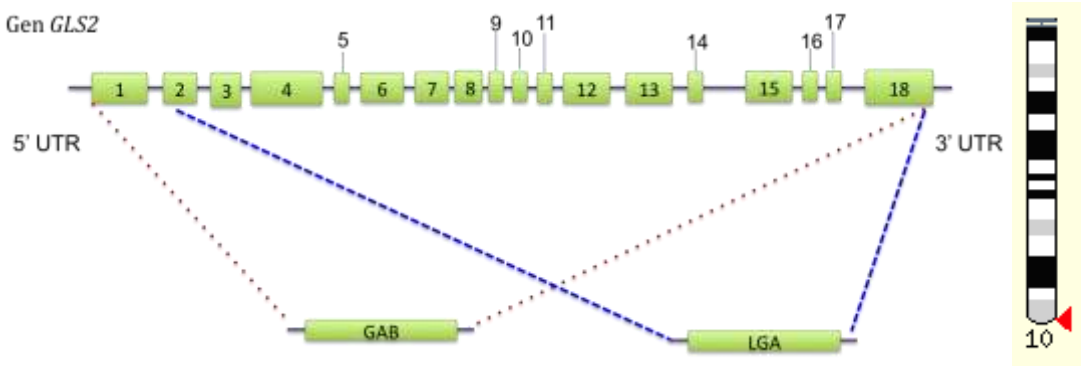


Figura 5. Gen *GLS2* de glutaminasa humana y transcritos alternativos GAB y LGA. El gen *GLS2* se encuentra localizado en el cromosoma 12 humano y codifica para los transcritos GAB y LGA (Aledo *et al.,* 2000). Este gen se encuentra en el cromosoma 10 de ratón, como se indica en la figura de la derecha.

La isoforma proteica LGA, inicialmente aislada de hígado de rata por Huang & Knox (1976), se pensaba que sólo se expresaba en hígado adulto (Patel & McGivan, 1984; Curthoys & Watford, 1995); sin embargo, actualmente se ha descrito para esta isoforma un patrón de expresión más amplio y complejo. La isoenzima GAB fue obtenida mediante clonación molecular a partir de una

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

genoteca de cDNA de células de cáncer de mama humano (ZR-75) (Gómez-Fabre *et al.,* 2000). Ambas isoformas (GAB y LGA) se expresan en cerebro (Olalla *et al.,* 2002), células tumorales humanas (Pérez-Gómez *et al.,* 2005), en las células β pancreáticas productoras de insulina (Baglietto-Vargas *et al.,* 2004) y en células del sistema inmune (Castell *et al.*, 2004).

Las isoenzimas GLS2 se localizan en mitocondria; sin embargo, también se ha descrito una localización nuclear para isoenzimas GLS2 (GAB y/o LGA) en neuronas (Olalla *et al.,* 2002; de la Rosa *et al.,* 2009; Márquez *et al.,* 2010) y astrocitos (Cardona *et al.,* 2015). Cabe destacar que la abundancia de expresión de los transcritos de GA se ha demostrado ser especie- y tejido-específica. Mientras KGA es la isoenzima predominante en cerebro de mamíferos (Olalla *et al.,* 2002; Martín-Rufián *et al.,* 2012), la abundancia relativa de las isoenzimas GLS2 en este tejido depende de la especie. Así, en cerebro de ratón el transcrito LGA es más abundante que GAB, al contrario de lo que ocurre en cerebro de rata, donde el transcrito GAB es el mayoritario; en cambio, en hígado de ratón GAB es la isoforma GLS2 predominante, mientras que en rata predomina LGA (Martín-Rufián *et al.*, 2012).

2.3 Diferencias moleculares y cinéticas entre isoenzimas GLS y GLS2

Las isoenzimas GLS y GLS2 difieren en sus propiedades moleculares y cinéticas (Tabla 1). La isoforma KGA es un tetrámero constituido por 3 subunidades de 66 kDa y una subunidad de 68 kDa (Perera *et al.,* 1991). La isoforma LGA hepática está formada por una subunidad de 58 kDa (Smith & Watford, 1988), si bien se desconoce si polimeriza en su proceso de activación por Pi, como ocurre con las isoenzimas GLS.

En cuanto a sus propiedades cinéticas, existen diferencias relativas a la dependencia por P_i, activación por amonio e inhibición competitiva por Glu, producto de la reacción (Tabla 1). La KGA tiene una alta dependencia por Pi (Krebs, 1935; Curthoys *et al.,* 1976), que induce un cambio conformacional en la enzima favoreciendo la interacción de la Gln con el centro activo (Chiu & Boeker, 1979; Cassago *et al*., 2012). Se ha descrito también un efecto inhibitorio del Glu en la KGA, tanto a bajas como altas concentraciones de Pi (Goldstein, 1966; Curthoys

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

y Watford, 1995).

Las isoenzimas GLS2 presentan una baja dependencia del Pi. Sin embargo, los requerimientos por el activador amonio y la inactivación por producto (Glu) difieren en función de la isoforma. La GAB se inhibe en presencia de concentraciones elevadas de Glu, presentando un valor IC_{50} de 50 mM a baja concentración de Pi (5 mM) y concentración no saturante de Gln (20 mM) (Campos-Sandoval *et al.*, 2007), lo que no le ocurre a LGA (Krebs, 1935; Patel & McGivan, 1984). Además, se ha demostrado que la isoforma LGA presenta un requerimiento absoluto por amonio como activador, mientras que, por el contrario, GAB muestra sólo un ligero efecto activador en presencia de amonio (Verhoeven *et al.,* 1983; Campos-Sandoval *et al.,* 2007) (Tabla 1). Por consiguiente, la isoforma GAB posee un comportamiento cinético híbrido entre las isoenzimas GLS y GLS2 (Campos-Sandoval *et al*., 2007).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tabla 1. Genes, transcritos e isoformas GA en humanos. (Adaptado de Márquez *et al.*, 2009)

Genes, transcritos e isoformas de GA en humanos				
	KGA	**GAC**	**GAB**	**LGA**
Gen	*GLS*	*GLS*	*GLS2*	*GLS2*
Longitud del transcrito	18 exones	15 exones	18 exones	17 exones
Mecanismo transcripcional	Ayuste alternativo	Ayuste alternativo	Canónico	Inicio alternativo de la transcripción
Regulación transcripcional	c-Myc, c-Jun	---	p53, TAp63, TAp73	---
Expresión	Ubicua en tejidos extrahepáticos de mamíferos y células de cáncer humano	Músculo cardiaco, páncreas, placenta, riñón, pulmón y células de cáncer humano	Hígado, cerebro, páncreas, sistema inmune y células de cáncer humano	Hígado, cerebro, páncreas, sistema inmune y células de cáncer humano
Tamaño proteína	669 aa	598 aa	602 aa	565 aa
Dependencia de Pi	Alta	Alta	Baja	Baja
Activación por amonio	No	No	Baja	Fuerte
Inhibición por glutamato	Fuerte	---	Moderada	No
Interacción proteica	Caitaxina, BMCC1s	---	GIP, SNT, Rac1	---

2.4 Proteínas que interaccionan con isoenzimas GA

Las principales diferencias destacables entre los genes *GLS* y *GLS2* se centran en los exones 1 y 18. Ambos genes comparten un 62% de homología en el exón 1; sin embargo, en el gen *GLS* codifica 129 aminoácidos y en el *GLS2* sólo 61. La importancia de esta diferencia radica en que estas secuencias son las implicadas en los procesos de translocación y envío a destinos subcelulares, además de actuar

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

como módulos de interacción proteína-proteína (Gómez-Fabre *et al.,* 2000) (Fig. 6).

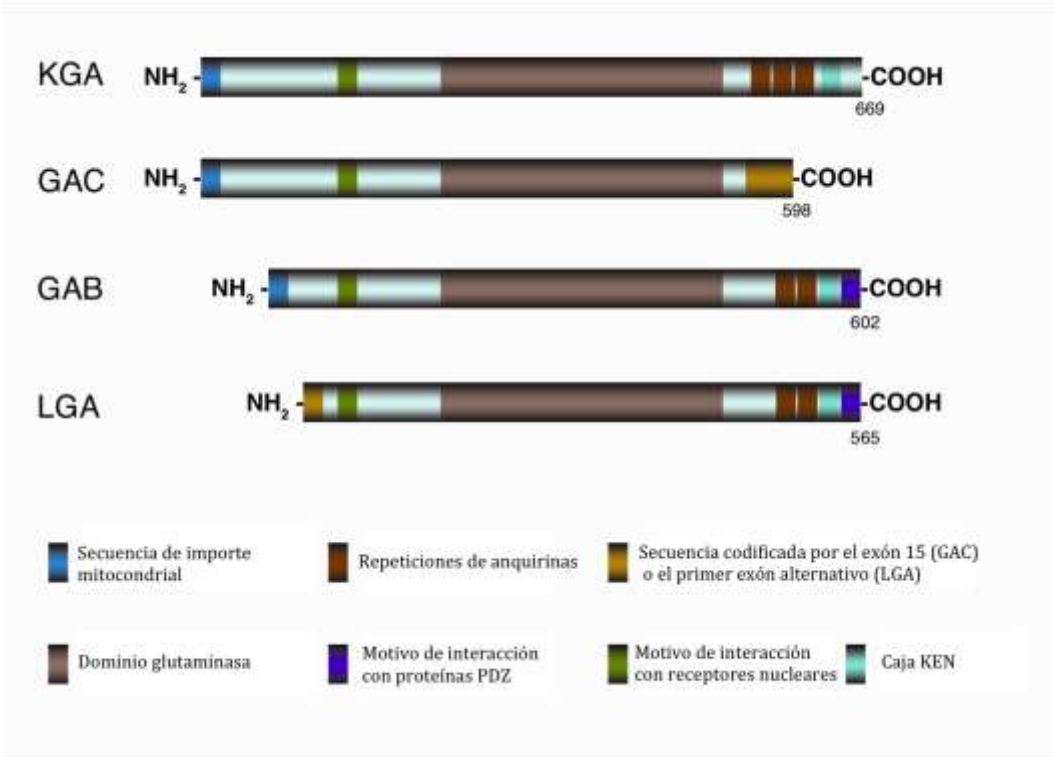


Figura 6. Principales dominios y secuencias consenso (motivos) de las isoformas GA de mamíferos. Se indican las diferencias entre las proteínas codificadas por los genes *GLS* y *GLS2,* las cuales se centran principalmente en los exones 1 y 18 donde se localizan las secuencias implicadas en la interacción proteína-proteína y los procesos de translocación subcelular (Adaptado de Márquez *et al.,* 2016).

La secuencia codificada por el exón 18 muestra igualmente diferencias entre ambos genes: en *GLS2*, la región C-terminal, concretamente los cuatro últimos aminoácidos, están implicados en el reconocimiento de dominios PDZ (Fig. 6) (Olalla *et al.,* 2001), denominados así por las tres primeras proteínas donde se identificaron: PSD-95, *Drosophila discs large protein* y *Zona occludens protein* 1 (Cho *et al.,* 1992). Estos dominios son motivos proteicos de 80-100 residuos de aminoácidos, muy conservados, que se pueden unir tanto a secuencias consenso (X-Ser/Thr-X-Val) en regiones C-terminal de proteínas diana, como a otras proteínas PDZ (Ponting, 1997). El estudio de la interacción entre proteínas es de especial interés ya que permite comprender su papel funcional, regulación y localización. Las isoenzimas GLS2 poseen la secuencia ESMV requerida en las interacciones con proteínas PDZ, siendo la valina final esencial para el

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

mantenimiento de la interacción (Olalla *et al.,* 2001). Hasta el momento, se han descrito dos proteínas PDZ que interactúan con la isoforma GAB: la proteína GIP (*Glutaminase-Interacting Protein*) y la alfa-1-sintrofina (SNT).

Cuando se analizó la expresión de GIP (también denominada *Tax-interacting protein 1*, TIP-1) en cerebro de rata y mono, se pudo observar que estaba presente tanto en el soma de neuronas y astrocitos como en los pies astrocitarios perivasculares. Fue en esta última localización donde se expresaba de forma conjunta con GAB, por lo que se ha propuesto un posible papel del Glu producido por esta isoenzima como vasodilatador, al unirse a su correspondiente receptor de las células endoteliales (Olalla *et al.,* 2008). Asimismo, se han descrito casos en que los dominios PDZ determinan la localización nuclear de las proteínas (Riefler & Firestein, 2001), por lo que no puede descartarse que uno de los mecanismos de importe de GAB al núcleo de neuronas y astrocitos tenga lugar a través de su dominio PDZ y su interacción con GIP. De hecho, GIP también se ha localizado en núcleo celular (Olalla *et al.,* 2008) y se ha demostrado que puede ejercer un papel regulador de la transcripción, en concreto mediante su interacción con β-catenina, proteína implicada en diferentes procesos como migración, proliferación y muerte celular. Esta asociación inhibiría la posterior interacción de β-catenina con el factor de transcripción 4 (TCF-4) en núcleo, necesaria para la activación de los genes Wnt (*Wingless/Int*) (Kanamori *et al.,* 2003). Igualmente, en el extremo C-terminal de su estructura primaria, GLS2 presenta repeticiones de anquirinas (Márquez *et al.,* 2006), que en otros casos también se han relacionado con el importe nuclear de proteínas (Sachdev *et al.,* 1998).

Las sintrofinas, por su parte, son una familia de proteínas periféricas de membrana que abundan particularmente en células gliales cerebrales (Ahn *et al*., 1996; Adams *et al*., 2001). Las principales isoformas son α-1, β-1 y β-2, que están codificadas por diferentes genes y se expresan en tejidos como músculo esquelético, corazón y cerebro (Ahn *et al.,* 1996; Gee *et al.,* 1998). El dominio PDZ de SNT puede unirse a la acuoporina 4 (AQP-4) en cerebro (Adams *et al.,* 2001); esta interacción se ha descrito concretamente en los pies atrocitarios perivasculares (Inoue *et al.,* 2002), donde podría actuar regulando la permeabilidad de la membrana (Frigeri *et al.*, 1995).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

En cuanto a proteínas que interactúan con las isoformas GLS, se ha demostrado que KGA interacciona con la proteína caitaxina o BNIP-H. Esta proteína, codificada por el gen *ATCAY*, se expresa en tejido nervioso, siendo especialmente abundante en hipocampo, córtex, cerebelo, núcleos cerebelares profundos y núcleo pontino (Bomar *et al.,* 2003; Buschdorf *et al.,* 2006). La interacción de KGA y caitaxina se lleva a cabo a través del dominio BCH (*BNIP-2 and Cdc42GAP Homology*) (Low *et al.*[1], 2000; Low *et al.*[2], 2000), regulando de esta manera su distribución espacial en cerebro. En experimentos de co-transfección de KGA y caitaxina en células P12, inducidas a diferenciarse a un fenotipo neuronal por estimulación con el factor de crecimiento nervioso (NGF), se observó una redistribución de KGA hacia los terminales de las neuritas, de manera independiente y separada de cualquier migración mitocondrial. Por consiguiente, la caitaxina parece ser capaz de re-localizar KGA desde el cuerpo celular hacia las neuritas. Aparte de este tráfico neuronal, la caitaxina redujo los niveles de Glu a través de la inhibición de la actividad GA (Buschdorf *et al*., 2006). En resumen, la interacción KGA-caitaxina parece tener un papel relevante en la regulación de la homeostasis de la síntesis de Glu, esencial para una neurotransmisión correcta y un adecuado desarrollo neuronal.

Otro miembro de la familia de proteínas que contienen dominios BCH, capaces de interaccionar con la isoforma KGA, es la proteína BMCC1. Este polipéptido posee distintas isoformas, una de las cuales, BMCC1s, se expresa mayoritariamente en cerebro de ratón y está implicada en la regulación de la dinámica del citoesqueleto y la supervivencia celular (Arama *et al*., 2012). Un análisis proteómico orientado a buscar proteínas que interactúan con BMCC1s identificó a KGA como una de ellas. Cuando se llevaron a cabo cultivos primarios de neuronas corticales transfectadas con ambas proteínas, se observó que la distribución subcelular de KGA fue dramáticamente alterada: la mitad de las células transfectadas mostraron a KGA no sólo en mitocondria, sino también en el citoplasma (Boulay *et al*., 2012). Los autores concluyeron que BMCC1s interacciona preferentemente con la forma precursora monomérica de KGA (74 kDa) en citoplasma, impidiendo que alcance la mitocondria y evitando su procesamiento hasta la forma madura catalíticamente activa.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.5 Glutaminasa en cerebro

El Glu es el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central (SNC) (Fonnum, 1984), y aproximadamente el 80-90% de todas las sinapsis cerebrales son glutamatérgicas (Braitenberg & Schüz, 1998; Attwell & Laughlin, 2001). Dicho aminoácido juega además un papel clave en la plasticidad sináptica y en la neurogénesis (Velletri *et al.,* 2013), flujo sanguíneo cerebral (Attwell *et al.,* 2010), metabolismo energético cerebral (Erecinska & Silver, 1990), patogénesis de enfermedades neuropsiquiátricas (Conti & Weinberg, 1999), en la síntesis del neurotransmisor inhibidor GABA (Walls *et al.*, 2014) y en la de muchos otros importantes metabolitos.

Dado que el Glu no atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica (BBB) (Hawkins, 2009), debe ser sintetizado en las neuronas a partir de precursores locales, estableciéndose un control preciso entre la neurona presináptica, postsináptica y el astrocito. En estas sinapsis tripartitas (Fig. 7), se establece el denominado ciclo Glu/Gln (Hertz, 1979), por el cual, el exceso de Glu liberado en la hendidura sináptica es capturado por los astrocitos gliales, que mediante la enzima GS, de localización exclusivamente astrocitaria (Martínez-Hernández *et al.*, 1977), se transforma en Gln. Esta Gln es liberada del astrocito y recapturada por las neuronas, donde vuelve a metabolizarse a Glu por la enzima GA. Este ciclo Glu/Gln entre las neuronas y los astrocitos está considerado como una ruta central para el reciclaje de neurotransmisores y para regular la neurotoxicidad intrínseca del Glu (Hertz, 1979; Berl & Clarke, 1983).

Como se ha indicado, en la sinapsis tripartita la GA juega un papel imprescindible en la homeostasis glutamatérgica como la fuente más importante de Glu presináptico liberado (Nicklas *et al*., 1987). A pesar de numerosas investigaciones, el origen del Glu neurotransmisor no ha sido completamente resuelto. Aunque se reconoce a la GA como la fuente principal de Glu, no debe ser la única ruta implicada (Shen *et al*., 2009). Se ha demostrado síntesis del neurotransmisor Glu mediante transaminación de aminoácidos con α-cetoglutarato, componente del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Waagepetersen *et al*., 2005).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

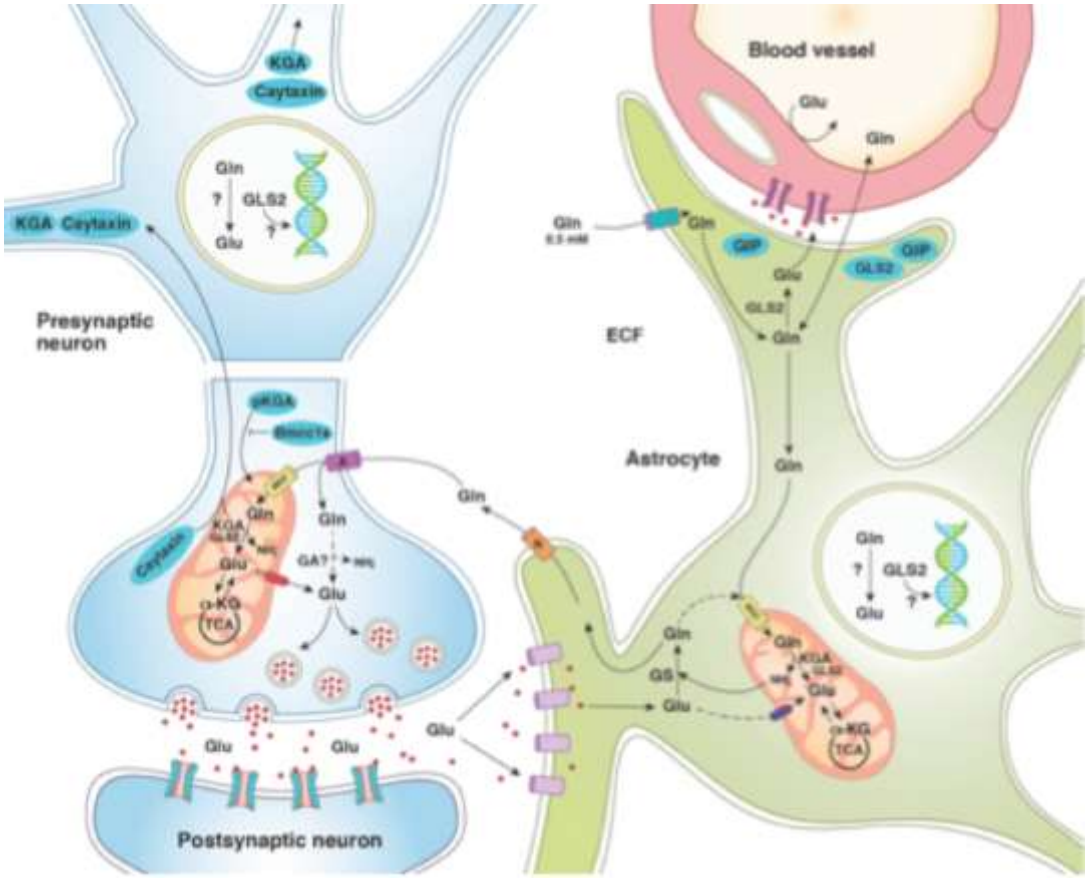


Figura 7. Esquema la sinapsis tripartita entre neuronas y astrocitos. La Gln liberada por el astrocito es transportada al interior de las neuronas presinápticas vía transportador SLC38A7 (miembro de la familia de transportadores de aminoácidos acoplados a sodio, SNAT). En el interior de la neurona presináptica la GA cataliza el paso de Gln a Glu, que se almacena en las vesículas sinápticas hasta su posterior liberación. En la hendidura sináptica el Glu es recapturado por el astrocito a través de los transportadores dependientes de sodio, EAAT1 y EAAT2, y convertido de nuevo en Gln por la acción de la enzima GS (Adaptado de Márquez *et al.,* 2009).

El modelo tradicional de expresión de GA aceptaba que la única isoenzima presente en cerebro, y responsable de la generación del Glu neurotransmisor, era la isoforma KGA (GLS) (Haser *et al*., 1985; Curthoys & Watford, 1995). Nuestro grupo fue el primero en descubrir la expresión simultánea de transcritos de mRNA para KGA y GLS2 en cerebro humano (Aledo *et al*., 2000; Gómez-Fabre *et al*., 2000). Posteriormente, demostramos la coexpresión de mRNA de KGA y GLS2 en cerebro de otras especies de mamíferos como vaca, ratón, conejo y rata (Olalla *et al.,* 2002). Esta coexpresión fue verificada a nivel de proteína por métodos bioquímicos e inmunológicos mediante inmunotransferencias Western revelados con anticuerpos isoenzima-específicos (Olalla *et al*., 2002). Además de cerebro, también se ha demostrado la coexpresion de ambas isoenzimas en las siguientes

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

líneas celulares humanas: células de tumor colorrectal (Turner & McGivan, 2003), células de hepatoma HepG2, células de leucemia mieloide KU812F y las células de cáncer de mama MCF7 y ZR75 (Pérez-Gómez *et al*., 2005). En relación a la proliferación, el papel desempeñado por las diferentes isoenzimas GA en células tumorales parece ser opuesto. Así, los niveles de KGA se encuentran elevados en estados proliferativos, mientras que en estados de quiescencia prevalecen las isoformas GLS2 (Pérez-Gómez *et al.,* 2005). Este comportamiento se ha confirmado en cáncer de hígado y en tumores gliales, que muestran un patrón de expresión elevado de GAC y KGA y no expresan LGA (Szeliga *et al.,* 2005). Experimentos de transfección de células T98G de glioblastoma humano con el cDNA de GAB, permite observar una reversión del fenotipo transformado, caracterizado por una menor migración celular, proliferación y una disminución de la supervivencia (Szeliga *et al.,* 2009). Como consecuencia del papel fundamental que desempeñan las isoformas GA en la biología del cáncer, se han postulado a estas proteínas como dianas terapéuticas para inhibir la reprogramación metabólica que conduce a la carcinogénesis.

Para cuestionar aún más el modelo tradicional de expresión de GAs en cerebro, hemos aportado sólidas evidencias experimentales de una segregación subcelular de GA en neuronas, la isoenzima KGA está presente en mitocondrias, mientras que la GA GLS2 se localiza en núcleo (Olalla *et al*., 2002). La localización nuclear de la GA GLS2 (GAB y/o LGA) fue completamente inesperada, cambiando drásticamente el paradigma de expresión aceptado de GA en mamíferos, siendo la primera vez que se describía una localización extramitocondrial para una GA. La visión de la GA como una proteína monofuncional, con un papel relevante pero exclusivamente catalítico, parece no responder a su auténtica potencialidad funcional. Este hecho viene apoyado también por la descripción ya comentada de las isoformas GLS2 con proteínas PDZ. Respecto a la localización nuclear, también conviene señalar que el análisis bioinformático de las proteínas GLS2 reveló la existencia de un dominio de dedos de Zn, concretamente del tipo Cys_2His_2, característico de muchos factores de transcripción (Fig. 6), dejando abierta la posibilidad de que estas isoenzimas funcionen directamente como un factor de transcripción. Además, aún cuando estas proteínas no poseen secuencias

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

específicas de localización nuclear, sí poseen un motivo LXXLL que constituye una secuencia de interacción con receptores nucleares (Fig. 6). Concretamente, la isoforma GAB posee este motivo consenso en los aminoácidos 72-76 (LGDLL). Un caso similar es el de la enzima mitocondrial 3-hidroxi-3-metilglutarilCoA sintasa (EC 4.1.3.5), que se ha detectado en el núcleo, y cuya translocación implica la interacción con un receptor hormonal nuclear a través de un motivo LXXLL presente en la enzima (Meertens *et al.*, 1998). La regulación de la transcripción génica a través de receptores nucleares requiere la participación de correpresores y coactivadores, de esta forma GAB podría formar parte de un complejo transcripcional, actuando como corregulador. La participación de GLS2 en núcleo podría ser, no obstante, indirecta, al actuar regulando los niveles de Gln/Glu en el nucleoplasma. Hoy en día, se acepta que los aminoácidos juegan un papel importante, junto con las hormonas, en el control de la expresión génica; aunque, los mecanismos moleculares implicados son todavía poco conocidos. En concreto, la Gln induce la expresión de proteínas HSP (*heat shock proteins*), tanto a nivel de mRNA como de proteína (Sanders & Kon, 1992), y reprime la expresión de GS. De esta forma, la importancia de la localización nuclear de GAB radicaría en el control *in situ* de los niveles de Gln/Glu, cuyas fluctuaciones inciden en la regulación de la expresión génica.

Se ha identificado también la presencia de GA en astrocitos (Márquez *et al*., 2016). Experimentos inmunohistoquímicos realizados en tejidos de cerebro humano y rata, con anticuerpos isoforma específicos, han puesto de manifiesto la expresión de isoenzimas GLS (KGA) y GLS2 (GAB/LGA) en neuronas y astrocitos, aunque mostrando diferentes localizaciones subcelulares: mitocondrial para la KGA y nuclear y mitocondrial para GLS2 (Márquez *et al*., 2016). La expresión de GA en astrocitos también se ha demostrado a nivel de mRNA y se ha probado la existencia de actividad enzimática en ciertas poblaciones astrocitarias (Cardona *et al*., 2015). La presencia de GA con actividad catalítica en astrocitos es relevante para la estequiometría del ciclo Glu/Gln en la sinapsis, lo que sugiere la posibilidad de nuevas funciones para las distintas isoformas GA.

Las nuevas localizaciones subcelulares descubiertas en cerebro para las isoformas GA sugieren nuevas funciones para la isoenzima GLS2 no relacionadas

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

con la neurotransmisión, sino con la regulación transcripcional y la diferenciación celular (Campos-Sandoval *et al*., 2015). El hecho de que en cerebro se expresen cuatro isoenzimas diferentes codificadas por dos genes distintos aún no ha sido explicado. No se conoce la contribución de cada isoenzima al *pool* de Glu neurotransmisor, así como el papel de alguna de estas isoenzimas, particularmente las GLS2, en funciones diferentes a las meramente catalíticas. Para aclarar estos aspectos, en este trabajo decidimos generar un modelo animal transgénico deficiente en el gen *Gls2* que nos permita arrojar luz sobre algunas de estas cuestiones, profundizando así en la función cerebral de las isoenzimas GA.

2.6 Neurotransmisión glutamatérgica en la adicción a drogas

Evidencias experimentales obtenidas desde 1970 han generado un consenso en el campo científico de la adicción a drogas de abuso, que señalan a la dopamina (DA) como neurotransmisor clave en sus efectos adictivos (Lüscher, 2016). De esta forma, la hipótesis dopaminérgica en el mecanismo de la adicción establece que las drogas ejercen una fuerte estimulación de dicho neurotransmisor en la ruta mesocorticolímbica (Di Chiara & Imperato, 1988), un rasgo generalizado y definitivo de todas las drogas adictivas, dando cuenta de los agudos efectos reforzadores que ejercen. No obstante, esta hipótesis no es capaz de explicar los efectos a largo plazo y las alteraciones comportamentales, como el ansia por la droga (*craving*) y la recaída, que aparecen cuando la droga ya se ha eliminado del organismo y los niveles de DA vuelven a los valores normales. Por este motivo, se ha sugerido que el consumo de drogas conlleva una serie de neuroadaptaciones en diferentes áreas cerebrales que desempeñan un papel causal en el comportamiento patológico de los pacientes adictivos (Lüthi & Lüscher, 2014).

Aunque muchos tipos de sinapsis pueden ser modificadas por el consumo de drogas, el foco se ha centrado sobre la transmisión glutamatérgica que ejerce un papel importante en la plasticidad sináptica (Lüscher, 2013). Resultados de estudios preclínicos con modelos animales de adicción sentaron las bases de la denominada hipótesis del Glu en la adicción, que propone la existencia de cambios en la neuroplasticidad inducidos por un desequilibrio entre el Glu sináptico y el no-sináptico en los circuitos entre la corteza prefrontal (PFC), el núcleo accumbens

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

(NAc) y el área tegmental ventral (VTA), lo que provoca una menor capacidad para inhibir el comportamiento de búsqueda de la droga y una mayor vulnerabilidad a la recaída (Kalivas, 2009; Steketee & Kalivas, 2011; Palomino *et al*., 2014). De entre las modificaciones glutamatérgicas, cabe destacar el papel de los receptores metabotrópicos de Glu (mGluR) y las proteínas Homer en los astrocitos del NAc (Fig. 8) (Ronesi & Huber, 2008). Las proteínas Homer actúan como un componente integral del complejo de señalización intracelular de los mGluR, mediando la liberación de calcio endoplasmático a través de la unión a receptores inositol trifosfato (IP_3R_s) (Yamamoto *et al.,* 2006). El astrocito utiliza este incremento del calcio intracelular para la liberación de Glu mediante el intercambiador estequiométrico de cistina-Glu (sistema Xc^-) (Malarkey & Parpura, 2008). Se ha demostrado que la administración crónica de cocaína disminuye la expresión de las proteínas Homer y del transportador Xc^- en el NAc, lo que provoca una menor liberación de Glu desde el astrocito. Los bajos niveles de Glu extracelular conllevan un bajo tono de los autoreceptores mGluR2/3 presinápticos, que tras la exposición repetida a drogas como cocaína, experimentan modificaciones en su estado de fosforilación, reduciendo el tono inhibidor que ejercen sobre la liberación presináptica de Glu (Xi *et al.,* 2000; Kalivas, 2004) (Fig. 8). Además, el incremento de Glu liberado en la hendidura sináptica tampoco se elimina eficientemente, puesto que el transportador GLT-1 astrocitario también está infra-expresado en el NAc tras la exposición crónica a cocaína, nicotina, etanol y heroína (Scofield & Kalivas, 2014).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

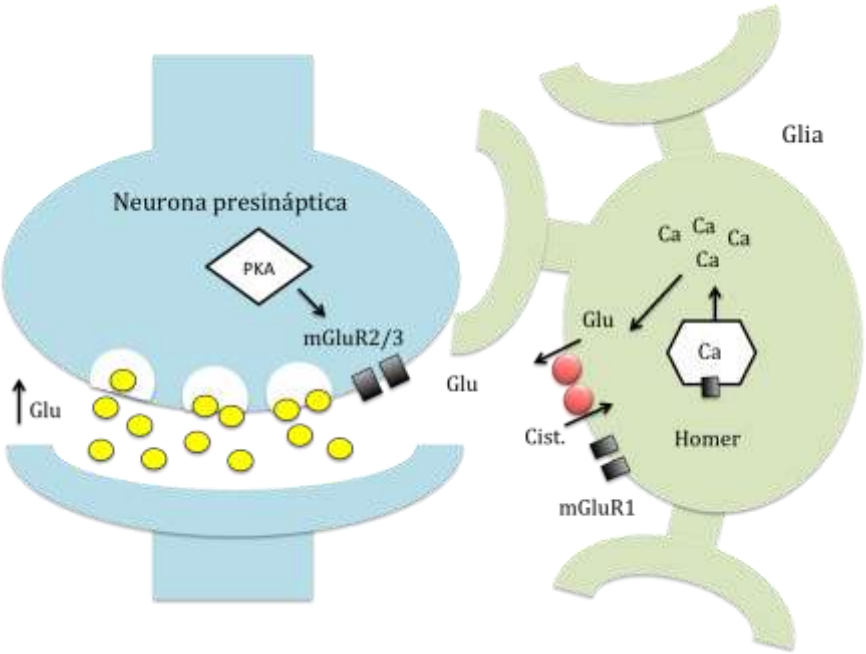


Figura 8. Modificaciones glutamatérgicas en el NAc que provocan nuevas formas de plasticidad sináptica. El consumo de drogas de abuso conlleva modificaciones en las proyecciones PFC-NAc, donde se ha visto un aumento en los niveles de Glu en la hendidura sináptica, con la consecuente activación de receptores AMPA postsinápticos, implicados en las plasticidad sináptica (Adaptado de Kalivas, 2004).

De igual manera, el consumo de cocaína produce cambios en los niveles de mRNA y actividad de las dos isoformas GA en el circuito corteza prefrontal-estriado. Sin embargo, hay una disociación temporal entre los efectos en la expresión del mRNA, afectados principalmente tras una exposición aguda a cocaína, y la actividad enzimática GA, afectada fundamentalmente tras una exposición crónica (Blanco *et al*[1]., 2012).

3. Ácido lisofosfatídico (LPA)

3.1 Síntesis y mecanismo de acción

Los lisofosfolípidos (LPs) son los lípidos integrantes de las membranas más estudiados. De entre ellos, destacan el ácido lisofosfatídico (LPA;1-acil-2-hidroxi-sn-glicero3-fosfato) y la esfingosina-1-fosfato (S1P). El LPA es una importante señal extracelular que se sintetiza a partir de fosfolípidos como la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina a partir de dos vías alternativas (Fig. 9). La primera implica la acción de la fosfolipasa D (PLD) que genera un ácido fosfatídico, sobre el que actúa consecutivamente la fosfolipasa A2 (PLA2) para generar LPA. En

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

la segunda vía, actúa la PLA2 que genera el lisofosfolípido correspondiente y, a continuación, la autotaxina (ATX) (Aoki *et al.*, 2008). La vía de acción de la ATX es la responsable de la síntesis del 50% del LPA en plasma, ya que ratones heterocigotos nulos para ATX (*Enpp2*$^{+/-}$) presentan una reducción de LPA del 50% (Van Meeteren *et al.,* 2006). En mitocondria y retículo endoplasmático existen vías alternativas para la síntesis de LPA, en las que actúan la glicerofosfato aciltransferasa (GPAT) o la monoacilglicerol-aciltransferasa (MGAT) (Gerrad, 1989; Haldar *et al.*, 1992; Bektas *et al.,* 2005; Yung *et.al*, 2014); que están implicados en la síntesis de precursores de glicerolípidos más que ser fuente de LPA extracelular.

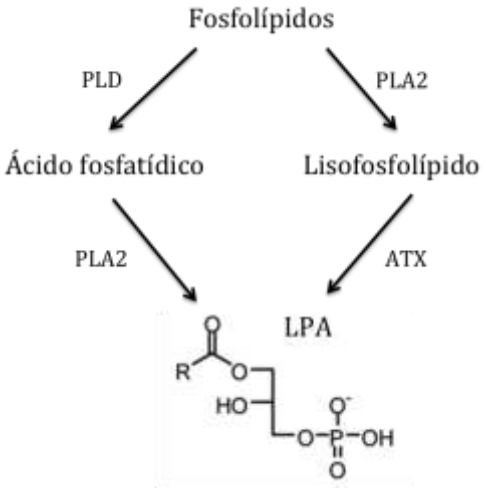


Figura 9. Vías de síntesis del ácido lisofosfatídico (LPA) extracelular.

El LPA ejerce su acción a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y da lugar a un amplio abanico de respuestas fisiológicas (Meer *et al.* 2008). Los GPCRs se caracterizan por tener siete dominios transmembrana (Pagès *et al.,* 2001; Makide *et al.*, 2009). El primero de ellos, LPA_1, fue identificado en 1996, desde entonces se han descrito otros cinco receptores de LPA (Hecht *et al.,* 1996). El gen que codifica dicho receptor es el gen *Lpar1* o gen de la zona ventricular (*Vzg-1*), denominado así por su amplia expresión en dicha región cerebral (Hecht *et al.,* 1996). Se localiza en el cromosoma 4 de ratón y codifica 5 exones, de los cuales el exón 3 posee hasta el 68% de la región codificante (Contos *et al.,* 1998).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

El receptor LPA_1 ejerce su acción a través de tres subtipos de proteínas G: $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ y $G_{12/13,}$ que activan diferentes cascadas de señalización (Fig. 10). Concretamente, $G_{q/11}$ activa la fosfolipasa C (PLC) que hidroliza el fosfatidilinositol bisfosfato y genera segundos mensajeros que activan a la proteína quinasa C (PKC), lo que conlleva cambios en los niveles de calcio intracelular. La activación de $G_{i/o}$ implica diferentes vías: 1) activación de fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K) que activa GTPasas como RAC (que controla la morfología celular) o la proteína quinasa Akt (antiapoptótica); 2) activación de RAS-MAPK y; 3) inhibición de la adenilato ciclasa (AC) lo que conlleva al incremento de AMPc. Por último, $G_{12/13}$ activa la GTPasa Rho y participa en la modificación de actina y el citoesqueleto (Fukushima *et al.,* 2001; Lin *et.al* 2010).

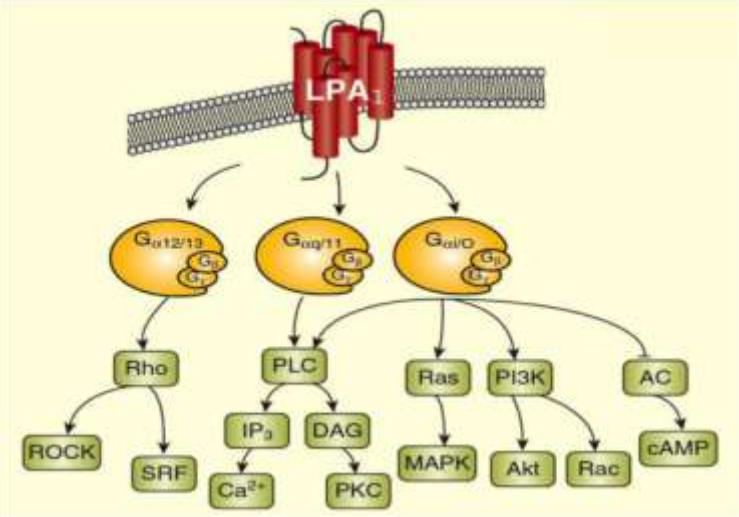


Figura 10. Cascada intracelular de LPA_1. LPA, que ejerce su acción a través de GPCRs, actúa en diferentes procesos celulares como: proliferación, supervivencia, migración, apoptosis y cambios morfológicos (Adaptado de Chun *et al.,* 2013).

3.2 Expresión de LPA_1 en cerebro de mamíferos

La expresión tisular del gen *Lpar1* es muy amplia, incluyendo cerebro, útero, testículos, pulmón, intestino delgado, corazón, estómago, riñón, bazo, timo, placenta y músculo esquelético. En cerebro se ha descrito como un importante factor implicado en el desarrollo (Ouchi *et al.,* 2008; Choi *et al.*, 2010).

Diferentes publicaciones han puesto de manifiesto la expresión de todos los subtipos de receptores LPA en el SNC. Durante el desarrollo cerebral se expresan

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

principalmente LPA_1, LPA_2 y LPA_4, mientras que en la etapa postnatal aumenta la expresión de LPA_3 (Ouchi *et al.,* 2008; Choi & Chun, 2013). Concretamente, LPA_1 se expresa en progenitores neurales, neuronas, oligodendrocitos y microglia, donde está implicado en diferentes funciones (Fig. 11). En neuroblastos LPA_1 ejerce funciones asociadas a proliferación, morfogénesis, migración, apoptosis y diferenciación. Se ha demostrado que la acción de LPA a través de la vía de señalización LPA_1-$G_{i/o}$ lleva a la diferenciación de los precursores corticales, aunque aún se desconocen los genes implicados (Fukushima *et al.,* 2007). En neuronas, la activación de LPA_1 induce retracción de las neuritas y el colapso de los conos axónicos como consecuencia de la activación de Rho GTPasas (Sayas *et al*., 1999). También se han descrito funciones de migración, supervivencia y sinaptogénesis en esta población celular (Choi & Chun, 2013). La comunicación entre astrocitos y neuronas es importante en el desarrollo y regeneración neuronal, habiéndose observado que los astrocitos, a través de la activación del receptor LPA_1 pueden inducir la diferenciación y maduración neuronal mediante la liberación extracelular de ciertas señales moleculares (Spohr *et al.,* 2008). Empleando modelos KO del receptor LPA_1 ($KOLPA_1$) se ha comprobado que este receptor podría ejercer un papel en la mielinización, expresándose en oligodendrocitos (Choi & Chun, 2013; Sheng *et al.,* 2015). Cabe destacar también la gran expresión de los receptores LPA_1 en microglia de ratón, donde su función se relaciona con estados de gliosis (Möller *et al.,* 2001).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

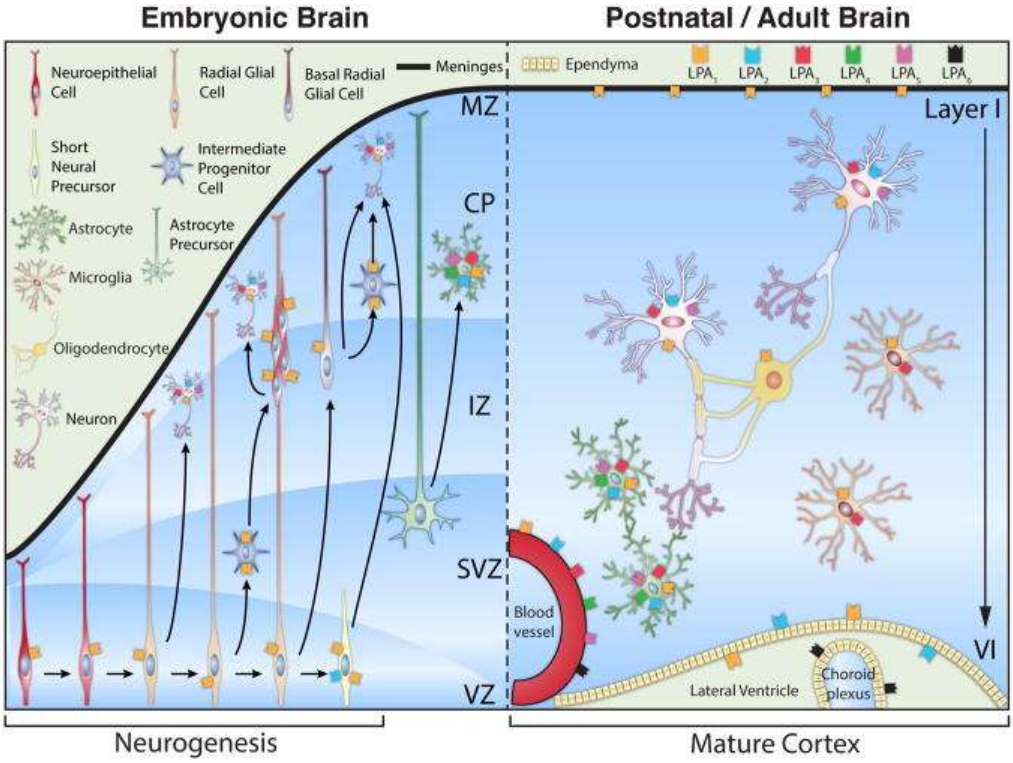


Figura 11. Acción de los receptores LPA en el cerebro embrionario y adulto. El patrón de expresión de los receptores LPA y su función varía durante la etapa del desarrollo cerebral. En el cerebro embrionario LPA media procesos de proliferación, retracción de neuritas, supervivencia, cambios morfológicos y migración celular. En corteza de cerebro adulto, así como en la BBB y células ependimarias, se expresan casi todos los subtipos de receptores LPA. En el estadio postnatal las funciones principales incluyen mielinización, respuestas inflamatorias por activación de la microglia, estabilización vascular y procesos cognitivos (Yung *et al.,* 2015).

Así mismo, es importante destacar el papel que ejerce LPA en los procesos de vasculogénesis, angiogénesis y maduración vascular. Actuando a través de la interacción con receptores que activan la vía $G_{12/13}$, LPA controla el desarrollo vascular embrionario, la migración y proliferación endotelial y ejerce un importante papel en la formación de la BBB (Teo *et al.,* 2009).

3.3 Modelos murinos transgénicos del receptor LPA_1

Como ya mencionamos anteriormente, de los animales KO podemos inferir muchas de las funciones de un gen. A continuación, se describen las características fenotípicas y comportamentales de ratones $KOLPA_1$, que posteriormente han sido modelo de estudio por parte de nuestro grupo de investigación.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Contos y colaboradores (Contos *et al.,* 2000) desarrollaron y caracterizaron un modelo murino transgénico del receptor LPA_1. Estos animales presentaban defectos craneoencefálicos, como hocicos más cortos y un mayor espacio entre los ojos, asociado al papel que este receptor tiene en el desarrollo del tejido óseo facial. Como consecuencia de la función de LPA en la estimulación y desarrollo de los adipocitos (activando los receptores adrenérgicos α2) los animales $KOLPA_1$ tienen menor tamaño corporal (Valet *et al.,* 1998). Los animales homocigotos nulos presentan una alta tasa de mortalidad perinatal como consecuencia de problemas en la lactancia, concretamente por fallos en la capacidad de localización de los pezones, debido a alteraciones en el bulbo olfatorio (Contos *et al,* 2000).

Durante la propagación de la colonia de ratones $KOLPA_1$ surgió una variable estable, que no presentaba mortalidad perinatal, y a la que se denominó variante Málaga ($maLPA_1$). Esta colonia, descrita por el grupo del Dr. Guillermo Estivill-Torrús, IBIMA (Estivill-Torrús *et al.,* 2008), presenta un desarrollo cortical alterado, con capas más delgadas y un patrón de distribución celular diferente al de los animales *wild type* (WT). En estos animales también se observa una disminución en la expresión de marcadores de la proliferación en las células progenitoras neurales (NPC) y una expresión más temprana de marcadores de diferenciación. El menor tamaño cerebral observado se atribuyó al papel antiapoptótico de LPA, sustentado por el aumento de actividad apoptótica de la SVZ y la corteza. Por tanto, la ausencia de LPA_1 conduce a una reducción de las NPC, una mayor apoptosis y alteraciones en la formación de la corteza (Estivill-Torrús *et al.,* 2008).

A partir de las pruebas de comportamiento realizadas, se determinó que los KO $maLPA_1$ presentaban una memoria espacial deficiente comparada con la de los animales WT. Otra de las características descritas fue un mayor tiempo de exploración periférica durante la habituación en el laberinto (tigmotaxis), relacionado con una mayor ansiedad y/o déficits motores (Santin *et al.,* 2009).

3.4 Modelo transgénico murino KO $maLPA_1$ y adicción

La exposición crónica a drogas de abuso induce cambios en la neuroplasticidad, que en modelos murinos puede evaluarse a través de la

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

locomoción condicionada y la sensibilización comportamental. La locomoción condicionada se define como el aumento en la locomoción basal en un contexto asociado a la administración de drogas. La sensibilización comportamental consiste en el progresivo aumento de la respuesta conductual como resultado de la administración repetida de la droga. Las bases anatómicas que subyacen ambos procesos son diferentes; así, la transmisión dopaminérgica en ganglios basales está implicada en la sensibilización comportamental, mientras que la locomoción condicionada está regulada por la transmisión glutamatérgica en el hipocampo (Pierce & Kalivas, 1997; Tzschentke & Schmidt, 2003; Mohn *et al.,* 2004). Estos parámetros se evaluaron en el modelo KO maLPA$_1$ y se observó que la locomoción condicionada era menor en los animales KO que en los WT, como consecuencia del déficit de memoria contextual que presentaban. La transmisión glutamatérgica en hipocampo dorsal estaba alterada, con una expresión reducida del receptor metabotrópico mGlu3 y la subunidad GLUR3 de los receptores AMPA (Blanco *et al*[2]*.,* 2012). Por el contrario, ni la sensibilización comportamental, ni la transmisión dopaminérgica se vieron alteradas respecto a los animales WT. Los autores concluyeron que LPA$_1$ podría actuar como un modulador de la respuesta condicionada por su papel en la regulación de la transmisión glutamatérgica (Blanco *et al*[2]*.,* 2012).

3.5 Modelo transgénico murino KO maLPA1 y neurogénesis

El receptor LPA$_1$ tiene un papel muy importante en la plasticidad sináptica por su efecto directo en los cambios morfológicos y funcionales de las espinas dendríticas. Mediante transfecciones de construcciones LPA$_1$-GFP en neuronas hipocampales se ha observado la presencia de este receptor en células piramidales de la región CA1, concretamente en dendritas apicales y una localización punteada característica de espinas dendríticas (Pipel *et al,* 2006).

En mamíferos, el cerebro presenta dos regiones donde la neurogénesis se mantiene activa durante la edad adulta: la zona subventricular y la zona subgranular del giro dentado (DG) del hipocampo (Álvarez-Buylla & Lim, 2004). Es en esta segunda zona donde los ratones KO maLPA$_1$ tienen una menor neurogénesis y menor arborización dendrítica (Matas-Rico *et al.,* 2008). La

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

neurogénesis hipocampal adulta está en estrecha relación con la vasculogénesis (Palmer *et al.,* 2000) y con factores tróficos como el BDNF (factor neurotrófico derivado de cerebro) y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) (Waterhouse *et al.,* 2012). Aunque no se han visto modificaciones en los vasos sanguíneos del DG de animales KO maLPA$_{1,}$ sí hay variaciones en los niveles de los factores tróficos, concretamente tras una exposición a ejercicio (proceso que incentiva la neurogénesis adulta), los niveles de BDNF disminuyen y aumentan los de IGF-1 en comparación con los animales WT (Matas-Rico *et al.,* 2008). Estos animales también tienen una expresión disminuida de GAP43 en la corteza (Estivill-Torrús *et al.*, 2008). Dicha proteína se expresa durante el desarrollo y está implicada en la guía axonal, la liberación de neurotransmisores y la plasticidad sináptica (Jacobson *et al.,* 1986).

En el modelo KOLPA$_1$ desarrollado por Harrison *et al.* (2003) se han descrito alteraciones neuroquímicas en el sistema serotoninérgico de diferentes áreas cerebrales (PFC, hipocampo, hipotálamo y NAc) y una reducción en la expresión de diversos aminoácidos en el hipocampo. Estas características son comunes a las existentes en modelos de esquizofrenia humanos, que presentan alteraciones en las sinapsis glutamatérgicas y disminución en el número de espinas dendríticas (Hayashi-Takagi *et al.,* 2010).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Objetivos

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

De acuerdo con los antecedentes expuestos en la introducción, es patente que aún quedan un gran número de cuestiones de calado por descubrir en relación con la función cerebral de las distintas isoenzimas GA; entre ellas, la contribución de cada isoforma al acervo de Glu neurotransmisor, el papel trófico de las GAs en el desarrollo y diferenciación neuronal, la función nuclear de GLS2 en neuronas y astrocitos, el significado fisiológico de sus interacciones con proteínas PDZ y BCH, su implicación en la regulación vascular de vasos sanguíneos y arteriolas y, finalmente, su desregulación en desórdenes neurológicos y enfermedades neurodegenerativas. Todos estos interrogantes hacen patente que la generación y caracterización de modelos animales transgénicos con expresión alterada de isoenzimas GA es una herramienta fundamental para elucidar la función cerebral de estas isoenzimas.

A la vista de estos antecedentes, nos planteamos los siguientes objetivos en esta Memoria:

- Generación de un modelo murino transgénico nulo condicional para el gen *Gls2.*

- Caracterización de alteraciones en las sinapsis glutamatérgicas en ratones *knockout* para el receptor LPA_1 del ácido lisofosfatídico.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Materiales y Métodos

MATERIALES

1. Vector de transgénesis

Con el fin de silenciar el gen *Gls2,* en la elaboración de este trabajo se empleó un vector de transgénesis de reemplazamiento adquirido del *International Mouse Phenotyping Consortium* (IMPC; EUCOMM). En la Fig. 1 se representan sus principales características. El vector está diseñado sobre el plásmido pBR322 e incorpora dos brazos de homología. El brazo largo, de 5.3 kb, está constituido por el exón 1 y un segmento del intrón 1 del gen *Gls2* murino; el brazo corto, por el espacio génico comprendido por los exones del 2 al 12 (3.9 kb). Los sitios loxP flanquean el fragmento del gen a eliminar, correspondiente a los exones del 2 al 7, (*floxed sequence*), por lo que al actuar la recombinasa Cre se escindirá el fragmento, generándose el KO correspondiente. Este plásmido permite llevar a cabo la selección de las bacterias que lo han incorporado, ya que posee un gen de resistencia a ampicilina y otro a blasticidina. La integración del vector resultante de la electroporación de las células ES murinas se selecciona mediante un gen de resistencia a geneticina (gen *neo*^{r}), por su parte, los eventos de recombinación homóloga se discriminarán de los de recombinación ilegítima gracias a la expresión de un gen de la toxina de la difteria codificado por el gen DTA. Los sitios FRT, que flanquean la *cassette* Neo, son lugares de reconocimiento para la recombinasa Flp. Cuando esta recombinasa se exprese permitirá la escisión de la *cassette* Neo.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

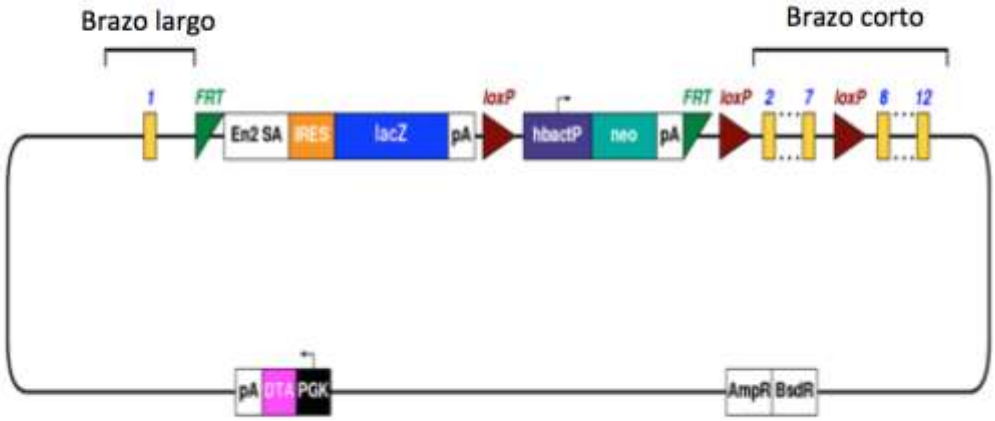


Figura 1. Representación esquemática de las principales características del vector de transgénesis. Se muestran las principales características del vector: en amarillo los exones del gen *Gls2;* los sitios de reconocimiento de la recombinasa Flp en verde (FRT); el En2SA (*Engrailed-2 splice acceptor*) aparece como un rectángulo blanco, seguido del sitio de reconocimiento interno ribosómico (IRES), el gen *lacZ* (en azul), y la señal de poliadenilación SV40 (pA); los sitios de reconocimiento de la recombinasa Cre (loxP) están representados por triángulos rojos; en morado el promotor de β-actina humano, y el gen de resistencia a neomicina (*neo*^{r}). En la parte inferior del vector, en blanco aparecen los genes de resistencia a blasticidina y ampicilina, para la selección en bacterias; y en rosa el gen de la toxina de la difteria (DTA) con su respectivo promotor y secuencia pA (Adaptado de la información suministrada por el Consorcio IMPC).

El vector de transgénesis sigue una estrategia denominada '*knockout first allele*' (Skarnes *et al.,* 2011) ya que al integrarse en el gen correspondiente generará un alelo KO (denominado tm1a), como consecuencia de la presencia de una trampa génica que conlleva la interrupción del proceso de transcripción (Fig.2). La trampa génica está constituida por una secuencia En2SA-IRES-LacZ-pA, que provoca la terminación prematura del proceso de transcripción por la presencia tanto de un aceptor de ayuste en la zona 3' (En2SA), como de una secuencia de poliadenilación (pA). El resultado de este proceso es una proteína de fusión constituida por el exón 1 del gen *Gls2* y la ß-galactosidasa. Una de las ventajas que presenta este sistema, además de poder obtener un alelo KO de forma directa al integrarse el vector en el genoma, es que permite estudiar el patrón de expresión de nuestro gen, ya que el gen *lacZ* se encuentra bajo el control de su mismo promotor.

De forma resumida, los pasos que habría que llevar a cabo cuando se utilicen vectores de transgénesis de este tipo implican que, tras la inserción del

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

vector en el cromosoma aceptor, se deberá eliminar la región comprendida entre los lugares FRT (la trampa génica), lo que dará lugar a un alelo idéntico al WT, salvo en la presencia de sitios loxP (alelo tm1c) que flanquean los exones que se pretenden eliminar. Posteriormente, los exones *floxed* se eliminarán mediante cruces con animales transgénicos que expresen la recombinasa Cre bajo un promotor específico cerebral, dando lugar al alelo tm1d, que en homocigosis generará el animal KO (Fig. 2). Todos estos pasos se describirán más detalladamente en los apartados correspondientes.

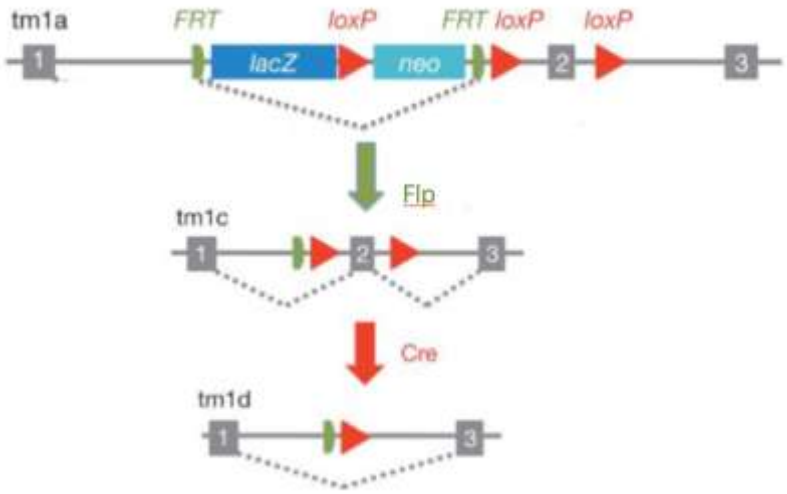


Figura 2. Pasos a seguir para eliminar las regiones delimitadas por los sitios FRT y loxP. La inserción del vector de transgénesis en el genoma dará lugar a un alelo KO denominado tm1a. Para revertir el genotipo, estos animales se cruzarán con ratones que expresen la recombinasa Flp, obteniéndose el alelo tm1c. Este alelo es idéntico al WT excepto por las regiones loxP de localización intrónica. Estas secuencias loxP, de reconocimiento por la recombinasa Cre, permitirán la escisión de los exones 2-7 generando el alelo tm1d (Adaptado de Skarnes *et al.,* 2011).

2. Cepas de *Escherichia coli*

Para la clonación molecular se utilizaron bacterias de la cepa DH5α, cuya característica principal es la presencia de mutaciones en los genes, recA y endA1. La mutación del gen recA limita los procesos de recombinación entre el plásmido y el genoma de *E. coli*. El gen endA1 codifica una nucleasa que favorece la integridad del DNA plasmídico.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3. Líneas celulares de mamíferos

En este trabajo se han utilizado dos líneas celulares, fibroblastos embrionarios murinos (MEF) inmortalizados y células embrionarias murinas ambas cedidas por el Dr. Alfonso Gutiérrez-Adán, del Departamento de Reproducción Animal (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria; INIA, Madrid).

Las características de estas líneas se comentan a continuación:

- Las células MEF derivan de embriones de ratón de la estirpe 129/Sv (resistentes a geneticina). Esta línea celular se co-cultivó con células ES, permitiendo así mantener su estado indiferenciado.

- Las células ES proceden de la masa celular interna (ICM) de blastocistos de ratones de la cepa B6D2F1 (ratones híbridos resultado de un cruce entre animales C57BL/6 y DBA/2). Esta línea celular fue la electroporada con el vector de transgénesis.

4. Animales de experimentación

Durante el desarrollo de esta tesis se han obtenido y mantenido cinco colonias diferenciadas de ratones:

- Ratones transgénicos de la cepa B6D2, que incluyen en su genoma la *cassette* transgénica.

- Ratones que expresan la recombinasa Flp (FlpE y FlpO) bajo un promotor de expresión ubicua CAG. Este promotor contiene las siguientes secuencias: un *enhancer* de citomegalovirus, el promotor y primer exón e intrón del gen de la β-actina, y un aceptor de ayuste (SA) del gen de la β-globina. Los ratones FlpE fueron cedidos por la Dra. Belén Pintado (CSIC) y los FlpO por el Dr. Carlos López Otín (Universidad de Oviedo). En estos ratones la enzima Flp fue modificada para conseguir que la temperatura óptima de actuación fuera 37ºC y no 30ºC como sucede en la enzima silvestre. A esta temperatura la tasa de expresión

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

de la enzima Flp es mayor en los ratones FlpO (Kanki *et al.,* 2006). El fondo genético de estos ratones es C57BL/6.

- Ratones que expresan la recombinasa Cre bajo un promotor específico de cerebro (sinapsina), lo que permitirá la generación de un modelo KO de GA *Gls2* en este tejido. Estos animales fueron adquiridos de Jackson Laboratory. El constructo transgénico se inyectó en ovocitos fertilizados de la estirpe B6/CBAF1 y los animales fundadores se cruzaron con animales WT C57BL/6NHsd. Los animales homocigotos son viables, fértiles, y normales en tamaño, y no muestran ninguna anormalidad física o de comportamiento. La actividad recombinasa se detecta en células neuronales a partir del día 12.5 del desarrollo embrionario (Jackson Laboratory, B6.Cg-Tg(Syn1-cre)671Jxm/J)

- Ratones KO para el receptor LPA_1, cedidos por el Dr. Guillermo Estivill-Torrús del instituto IBIMA. Estos ratones surgieron espontáneamente durante la expansión de la colonia original (Contos *et al*., 2000), al cruzar entre si los parentales heterocigotos fundadores (cepa híbrida C57BL/6Jx129/SvJ). Esta variable estable se denominó maLPA1. En esta memoria utilizaremos $KOLPA_1$ para referirnos a los ratones KO de la colonia $maLPA_1$. Todos los experimentos que se han realizado con este modelo transgénico se llevaron a cabo con machos de aproximadamente 3 meses de edad, en los tres genotipos: WT, ratones heterocigotos (HT) y homocigotos ($KOLPA_1$).

Los animales se mantuvieron en el bioterio de la Universidad de Málaga con un ciclo de 12 h luz/oscuridad, con comida y agua *ad libitum.* Todos los procedimientos se llevaron de acuerdo a las legislaciones de investigación animal (RD53/2013 y 2010/63/UE) de España y de la Unión Europea, respectivamente. Todos los experimentos realizados con animales fueron aprobados previamente por el Comité de Ética de la Universidad de Málaga.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

MÉTODOS

METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE ANIMALES KO *Gls2*

1. Validación del vector de transgénesis

Antes de electroporar las células ES con el vector de transgénesis, fue validado mediante digestión enzimática y secuenciación.

1.1 Obtención de células competentes

Para la amplificación de plásmidos se transformaron células de la cepa DH5α, para ello se prepararon previamente células competentes a partir de colonias aisladas de *E. coli*, que se dejaron crecer en medio LB (véase Anexo I) toda la noche (O/N), en agitación (200 rpm) y aireación a 37ºC. A la mañana siguiente, 200 µl de este precultivo (Abs aproximada a 600nm, $DO_{600,}$ de 1,2-1,4), se inoculó en 50 ml de medio LB dejándose crecer en agitación durante tres horas. Cuando el cultivo alcanzó una DO_{600} de entre 0.4-0.6 (correspondiente con la fase exponencial de crecimiento) se centrifugó a 2.500 g (Beckman J2-HS, rotor J17) a 4ºC durante 5 min. A continuación, se eliminó el sobrenadante y el precipitado de bacterias se resuspendió en 15 ml de $MgCl_2$ 100 mM frío. Tras centrifugar de nuevo en las mismas condiciones, las bacterias se resuspendieron en 15 ml de $CaCl_2$ 100 mM frío y se dejaron en hielo durante 30 min. A continuación, se centrifugó a 2.500 g y las bacterias se resuspendieron en 3 ml de $CaCl_2$ 100 mM y glicerol al 15% (v/v). Las bacterias competentes se dividieron en alícuotas de 250 µl y se congelaron a -80ºC hasta su utilización.

1.2 Transformación de bacterias DH5α

La transformación se efectuó mediante choque térmico, para lo cual 100 µl de bacterias DH5α competentes se incubaron con 20 ng del DNA plasmídico y se incubaron en hielo durante 25 min. Tras este periodo se indujo el choque térmico incubando la mezcla a 42ºC durante 2 min. Tras incubar en hielo durante 3 min, se añadió 1 ml de medio LB atemperado y se incubó en agitación durante 45 min a 37ºC. Posteriormente, se sembraron en placas de LB-ampicilina (véase Anexo I). Las placas se incubaron durante 12h a 37ºC. A la mañana siguiente se aislaron colonias de las placas de LB y se inocularon individualmente en 50 ml de LB con

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

ampicilina a una concentración final de 50 µg/ml. Finalmente, se incubó O/N a 37ºC con agitación (200 rpm).

1.3 Aislamiento de DNA plasmídico

A la mañana siguiente, se recogió el cultivo y se centrifugó a 5.000 g durante 10 min. El aislamiento y purificación del DNA se realizó siguiendo los pasos indicados en el protocolo de la casa comercial Promega para la realización de purificaciones a escala mediana de plásmidos (PureYield™ Plasmid MidiPrep System).

Posteriormente, se estimaron la pureza y concentración de las muestras mediante la medida de absorbancias a 260 y 280 nm, empleando un espectrofotómetro UV-visible (Thermo Scientific, NanoDrop 2000c Spectrophotometer).

1.4 Análisis de restricción del vector de transgénesis

Para asegurar el correcto estado del vector de transgénesis se realizaron análisis de restricción utilizando las enzimas *Eco*RV y *Sac*I (Fermentas). Todas las digestiones se llevaron a cabo a 37ºC durante 2 h, en un volumen final de 20 µl, con los tampones indicados por la casa comercial para el 100% de actividad y partiendo de 500 ng de DNA plasmídico.

Las muestras digeridas se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v), con GelRed (Viagen Biotech) en tampón TAE (Anexo I). Para el revelado de los geles se utilizó el sistema de fotodocumentación Gel Doc XR (Bio-Rad).

1.5 Secuenciación del vector de transgénesis

Aunque el vector de transgénesis había sido previamente secuenciado por el consorcio IMPC, donde fue adquirido, quisimos de nuevo secuenciarlo parcialmente para asegurar que no se había producido ninguna mutación. La empresa que llevó a cabo la secuenciación fue StabVida (Portugal). Los cebadores se obtuvieron a través del servicio de Biología Molecular de los Servicios Centrales

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

de Apoyo a la Investigación (SCAI, Universidad de Málaga). En la Tabla 1 se indica su secuencia. Los resultados obtenidos se adjuntan en el Anexo II.

Tabla 1. Nombre y secuencia de los cebadores utilizados para secuenciar el vector de transgénesis

Cebador	Secuencia 5'-3'
In2FW	CCAAGTCCAGAGGAGAACACCTTTCGT
In5Fw	GTGATGCTGGGCCTTGTAGT
LacZFw	GCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGC

2. Co-cultivo de células ES y MEF

2.1 Cultivo de fibroblastos embrionarios murinos inactivados

Para mantener el estado indiferenciado de las células ES murinas además de factores como el LIF (factor inhibidor de la leucemia) en el medio de cultivo, es necesario el co-cultivo con MEF resistentes a geneticina.

Con el fin de conseguir el arresto mitótico de estas células, los MEF fueron inactivados con mitomicina C (Sigma) a una concentración final de 10 µg/ml. Para ello, cuando el cultivo llegó a confluencia se retiró el medio de la placa petri de 150 mm (P150) y se reemplazó por medio EF fresco (Anexo I) con mitomicina C, incubándose a 37ºC durante 2-3 h. Tras esta incubación, la placa se lavó dos veces con tampón PBS (Anexo I). Posteriormente, se añadieron 5 ml de tripsina (HyClone, GE HealthCare), durante 2 min a 37ºC, con el fin de conseguir la separación de las células de la placa. La acción de la tripsina se inactivó mediante la adición de medio EF (25 ml) fresco. Las células se resuspendieron y distribuyeron en placas petri de 35 mm (P35). Estas placas deben estar previamente gelatinizadas; para ello, se cubren con gelatina al 0.1% (G-1890, Sigma) durante 1 h, tras lo cual se retira el exceso y, sin dejar secar, se cultivan los fibroblastos inactivados. A continuación, las placas se incuban a 37ºC y 5% CO_2. Se mantuvieron durante un periodo de tiempo no superior a 15 días, cambiándose el medio cada dos días.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.2 Cultivo de células ES murinas

Dado que las células ES presentan una tasa de división elevada, es importante realizar subcultivos periódicamente evitando que alcancen la confluencia, ya que el contacto entre ellas podría llevar a su diferenciación y con ello a la pérdida de su pluripotencia.

Se partió de un stock congelado a -80ºC, por lo que se descongeló a 37ºC y se diluyó en 9 ml de medio de cultivo EF. A continuación, se centrifugó a 1.500 rpm (Hettich Rotofix 32A, rotor 1619) durante 5 min. Más tarde, el precipitado de células se resuspendió en 2 ml de medio de cultivo de ES (Anexo I), hasta conseguir una suspensión unicelular, y se depositaron sobre los MEF inactivados en una placa P35. Las células se incuban a 37ºC en una atmósfera al 5% de CO_2 cambiándose el medio diariamente.

No es conveniente mantener los cultivos de células ES durante un periodo de tiempo prolongado, por lo que los experimentos se programaron para realizar el mínimo número de pases.

3. Electroporación de células ES murinas con el vector de transgénesis

3.1 Digestión enzimática del DNA plasmídico

Antes de la electroporación de las células ES es necesario hacer lineal el vector de transgénesis, mediante digestión enzimática, seleccionando una endonucleasa de restricción que genere un corte único fuera de la zona de homología del vector. Se utilizaron la enzima *AsiS*I (SfaAI, ThermoFisher) y aproximadamente unos 20 µg de DNA plasmídico. Como en casos anteriores, la reacción se llevó a cabo en el tampón recomendado por la casa comercial, el tampón *Tango*, a 37ºC. La digestión fue analizada por electroforesis en geles de agarosa al 0.6 % (p/v).

A continuación, se llevó a cabo una extracción con fenol-cloroformo (fenol pH8, P4557, Sigma) y se precipitó el DNA con etanol. Para ello, se añadió un volumen de fenol-cloroformo y se agitó en vórtex hasta obtener una sola fase. Se

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

centrifugó a 14.000 rpm (Hettich Universal 320R, rotor 1420) durante 5 min y se recogió la fase superior. Se añadió un volumen de cloroformo, se mezcló y se centrifugó a 14.000 rpm durante 1 min. Posteriormente, el DNA se precipitó con dos volúmenes de etanol 100% y acetato potásico (pH 5.2) a una concentración final de 0.3 M, se agitó por inversión y se dejó a -20ºC al menos 1h. Después se centrifugó a 4ºC durante 40 min a 14.000 rpm y se lavó dos veces con etanol al 70% (14.000 rpm durante 10 min). El precipitado se resuspendió en el medio de electroporación (Gene Pulser Electroporation Buffer, Bio-rad)

3.2 Electroporación de las células ES murinas con el vector de transgénesis

Para llevar a cabo la electroporación se partió de células ES en fase de crecimiento exponencial tardía, a las que se les había refrescado el medio unas 3 h antes. Las células se centrifugaron a 300 g (IEC HN-S Centrifuge, rotor 815) durante 6 min, se lavaron con PBS y se centrifugaron de nuevo en las mismas condiciones. Tras eliminar el sobrenadante se resupendieron en 750 µl del medio específico para la electroporación y se añadió el vector de transgénesis lineal.

La mezcla se añadió a la cubeta (MicroPulser Electroporation Cuvettes, Bio-Rad) evitando la formación de burbujas. Para la electroporación (Gene Pulser Xcell Electroporation System, Bio-Rad) se emplearon las siguientes condiciones: un pulso de 300 V durante 500 µs a temperatura ambiente (RT). Posteriormente, la mezcla se dejó 5 min a RT antes de pasar las células a 5 placas P35 (en las que previamente se habían dispuesto fibroblastos inactivados). Las placas, se incubaron a 37º C y 5% de CO_2.

Como control negativo se utilizaron células ES a las que no se les adicionó el vector de transgénesis, pero que se trataron bajo las mismas condiciones indicadas anteriormente.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

4. Selección y genotipado de las células ES murinas transgénicas

4.1 Selección con geneticina (G418)

Tras 24 h desde la electroporación (tiempo suficiente para que la incorporación y transcripción del vector se haya llevado a cabo), se cambió el medio de cultivo a las células ES por medio fresco con G418 (A1720, Sigma) a 150 µg/ml. La adición de este antibiótico permite eliminar las células que no hayan incorporado la *cassette* transgénica. El proceso de selección se prolongó durante 8 días, momento en el que no se observaron células ES en las placas control. Las células que sobrevivieron al proceso de selección se sometieron a un posterior análisis por PCR. Para ello, dichas células se picaron con una punta de pipeta P20 y se transfirieron a placas de 96 pocillos (P96). Se adicionaron 50 µl de tripsina, la cual se dejó actuar 2 min aproximadamente y se inactivó con 50 µl de medio ES fresco, tras lo cual se resuspendieron hasta conseguir una suspensión unicelular. Los 100 µl de la mezcla anterior se transfirieron a nuevas placas P96 con MEF inactivados. Finalmente se añadió medio hasta 200 µl y se incubó a 37º C y 5% CO_2.

Tras 3-4 días (cambiando el medio diariamente) las células ES están aproximadamente al 80 % de confluencia y se pueden congelar y analizar su DNA. Para ello, se lavaron con 200 µl de PBS, se añadieron 30 µl de tripsina y posteriormente se adicionaron 70 µl de medio ES. De cada pocillo se tomaron 50 µl y se depositaron en una placa mutipocillo P24 tratadas con MEF inactivados (se completó hasta 1 ml de medio ES) para su posterior análisis por PCR. Los 50 µl restantes se congelaron a -80ºC en medio de congelación (medio ES con FBS al 50% y DMSO al 10%).

4.2 Genotipado de las células ES murinas transgénicas

4.2.1 Extracción del DNA de las células ES murinas transgénicas

Cuando las células crecieron lo suficiente se recolectaron de forma equivalente a la descrita en los apartados anteriores. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado dos veces con PBS. Posteriormente, las células se resuspendieron en 100 µl de tampón de digestión (50 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% SDS) y proteinasa K (Roche), a una concentración final de

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

100 µg/ml, tras lo cual se incubaron a 55ºC durante 1 h. A continuación, se realizó una extracción con fenol-cloroformo, seguida de una precipitación con etanol y acetato potásico, tal como se ha descrito en apartados anteriores. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 50 µl de tampón TE (Anexo I).

4.2.2 Genotipado por PCR de las células ES murinas transgénicas

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando la enzima *GoTaq Flexi DNA Polymerase* (Promega) con el buffer 5x Colorless *GoTaq Flexi* Buffer y 25mM $MgCl_2$. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de mezcla de 25 µl, conteniendo: 2 mM $MgCl_2$, mezcla de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (stock dNTPs a 100 mM, Roche) 0.1 mM, cebadores a 0.4 µM y 0.7 U de la enzima *Taq* polimerasa.

En la Tabla 2 se indican las secuencias de los cebadores utilizados para la PCR. El cebador Int1-Fw aparea con una secuencia específica del intrón 1 de *Gls2*, mientras que LaR3Rv aparea específicamente con la *cassette* transgénica, por lo que el amplicón de 270 pb sólo se amplificará en las células que hayan incorporado la *cassette*. De forma análoga, los cebadores que amplifican el gen *neo*^{r} reconocen la secuencia específica de este gen, generando un amplicón de 492 pb. Ambos fragmentos se purificaron de geles de agarosa mediante el kit Ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Helthcare) y se secuenciaron (Anexo II).

Tabla 2. Nombre y secuencia de los cebadores utilizados para el genotipado por PCR de las células ES murinas transgénicas.

Cebadores	Secuencia 5'-3'
Int1-Fw	TCCACCTGAGTGAGGTAGACATCC
LaR3-Rv	CAACGGGTTCTTCTGTTAGTCC
Neo-FW	GGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGC
Neo-Rv	AAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCG

Como control negativo de la reacción se utilizó DNA de ratón WT, agua como control de contaminación y el propio vector de transgénesis como control positivo.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

La reacción se llevó a cabo en un termociclador de Bio-Rad (MyCycler, thermal cycler) bajo las siguientes condiciones:

- Para la amplificación con la pareja de cebadores Int1-Fw y LaR3-Rv: 94 ºC durante 5 min, seguido de 30 ciclos con el siguiente programa: 94ºC 50 s, 63ºC 30 s y 72ºC durante 1 min. Se adicionó un ciclo final de extensión de 10 min a 72 ºC.

- Para la amplificación con la pareja de cebadores Neo-Fw y Neo-Rv: 94 ºC durante 3 min, seguido de 35 ciclos con el siguiente programa: 94ºC 15 s, 65ºC 20 s y 72ºC durante 1 min. Se adicionó un ciclo final de extensión de 5 min a 72 ºC.

Siguiendo las recomendaciones del consorcio IMPC, y antes de realizar la *long range* PCR (LRPCR) y el Southern blot, que permiten confirmar que la recombinación entre el vector de transgénesis y el genoma de las ES murinas fue homóloga, se llevó a cabo una PCR para confirmar la presencia del sitio loxP situado en la región 3', y con ello demostrar la completa integración del vector. Para ello, se utilizaron los cebadores indicados en la Tabla 3 y el siguiente programa de amplificación: 94 ºC durante 3 min, 35 ciclos de: 94ºC 15 s, 63ºC 20 s y 72ºC durante 1 min. Se adicionó un ciclo final de extensión de 5 min a 72 ºC.

Tabla 3. Nombre y secuencia de los cebadores utilizados para el genotipado por PCR de la región 3' loxP de las células ES murinas transgénicas.

Cebadores loxP	Secuencia 5'-3'
Ex7-FW	CTGGTGCCATTGTGGTCAGC
In7-RV	GCCTGATGGTGTTGTCCTC

El cebador Ex7-Fw aparea con una secuencia del exón 7 y el In7-Rv lo hace en el intrón 7, entre los cuales se sitúa la secuencia loxP, amplificándose un fragmento de 318 pb. La banda se purificó del gel de agarosa con el kit Ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Helthcare) y se envió a secuenciar para asegurar la presencia del sitio loxP (véase Anexo II).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

4.2.3 Genotipado por *Long Range* PCR (LRPCR) de las células ES murinas transgénicas

Se realizó un genotipado mediante análisis por LRPCR para asegurar que la recombinación entre el vector de transgénesis y el genoma de la célula ES fue homóloga. Para la realización de la LRPCR se utilizó el kit *Expand Long Template PCR System* (Roche). Éste contiene una mezcla enzimática de *Taq* DNA polimerasa y *Tgo* DNA polimerasa, una polimerasa termoestable con actividad correctora. Esta mezcla de polimerasas permiten amplificar hasta 20 kb de DNA genómico con alto rendimiento.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl, dejando el tampón a una concentración final de 1x (stock a 10x con 17.5 mM de $MgCl_2$), empleando: mezcla de desoxinucleótidos trifosfato 0.35 mM, cebadores 0.3 µM y 2 U de *Taq* DNA polimerasa.

El ciclo utilizado para la LRPCR es ligeramente distinto al de una PCR de secuencias de menor tamaño. La temperatura de hibridación se suele fijar entre los 55 y 60ºC, independientemente de la T_m de los cebadores y la temperatura de extensión se fija en 68ºC, por debajo de los 72ºC normalmente utilizados en una PCR convencional.

El programa de amplificación utilizado fue: 93º durante 3 min, 10 ciclos de: 94ºC 10 s, 63ºC 30 s y 68ºC durante 5 min, seguido de 25 ciclos de: 94ºC 10 s, 60ºC 30 s y 68ºC durante 5 min (20 s extra por ciclo). Se adicionó un ciclo final de extensión de 5 min a 68 ºC.

Tabla 4. Nombre y secuencia de los cebadores utilizados para la LRPCR de las colonias ES murinas transgénicas.

Cebadores	Secuencia 5'-3'
LRPCR-Fw	AGTGCTGTGAGGGCTGAGGTCAGGTGAGTGAAAG
LRPCR-Rv	TGTGGAGGGTGGTGTGGGAAAGGGTTCGAAGTTC

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

4.2.4 Genotipado de las células ES murinas transgénicas mediante transferencia Southern

Se realizó un análisis por transferencia Southern de las células ES transgénicas para confirmar que el proceso de recombinación fue homólogo. Para ello se llevo a cabo una extracción de DNA con fenol/cloroformo, tal y como se ha descrito en apartados anteriores. Una vez confirmada la integridad de dicho DNA por electroforesis en geles de agarosa al 0.6% (p/v), se procedió a la digestión enzimática del DNA con la enzima *BstE*II (Thermo Fisher Scientific). Esta enzima realiza un corte en la región 5' flanqueante del gen *Gls2*, anterior a la zona de homología específica del vector, y otro corte en la *cassette* transgénica, concretamente en el exón 2 (véase Anexo II para un mayor detalle de la estrategia seguida).

Para la digestión se utilizaron aproximadamente 15 µg de DNA que se llevaron a un volumen final de 200 µl en agua. Se añadió el volumen apropiado de tampón de la enzima de restricción (concentración final 1x) y la mezcla se agitó varios minutos a 4ºC, dejando incubar 1 h. Posteriormente se añadieron 20 U de enzima y se dejó a 4ºC varios minutos. Seguidamente, la muestra se incubó a 37ºC durante media hora, tras lo cual se añadieron 20 U de enzima adicionales. La mezcla de digestión se dejó durante 16 horas a 37ºC. A la mañana siguiente se comprobó en un gel de agarosa que la digestión enzimática del DNA genómico se hubiera completado en su totalidad, tras lo cual, se procedió a precipitar la muestra con acetato sódico 0,3 M (pH 5.2) y dos volúmenes de etanol absoluto. Después de lavar con etanol 70%, la muestra se secó al aire durante 10 min y se resuspendió en 30 µl de agua, dejándose a 4ºC O/N.

La electroforesis de DNA se realizó en geles de agarosa al 0,7% (p/v) en una cama de 20 cm de longitud en tampón TBE 0.5x (Anexo I), con 7.5 µl de GelRed. Como patrón de masa molecular se utilizó el digerido de DNA del fago lambda con la enzima *Hind*III. La electroforesis se llevó a cabo a 15 V durante la primera media hora, seguido de 30 V durante 2 días a 4ºC, hasta que se obtuvo la separación necesaria entre las bandas para resolver los fragmentos.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

4.2.4.a Tratamiento del gel de agarosa y transferencia a membranas de nylon

Antes de llevar a cabo la transferencia, el gel de agarosa se sumergió durante 10 min en una solución de 0.25 M HCl. A continuación, se sumergió en solución desnaturalizante (1.5 M NaCl y 0.5 M NaOH) durante 40 min, con un cambio de medio, y, finalmente, se neutralizó en 1.5 M NaCl y 0.5 M Tris base (pH 8) durante 40 minutos, cambiando el medio a los 20 min.

La transferencia se llevó a cabo por capilaridad durante 16 h empleando membranas de nylon (Hybond$^+$, GE Healthcare), siguiendo el protocolo descrito por Davies *et al.* (1986) y Ausubel *et al.* (1989). Como tampón se empleó SSC 20x (3 M NaCl y 0.3 M citrato sódico, pH 7). Posteriormente las membranas se lavaron con tampón SSC 2x, se secaron y el DNA se fijó por la acción de luz UV (UVC 500 Crosslinker, Amersham Bioscience).

4.2.4.b Obtención de la sonda de hibridación

La sonda de DNA utilizada en los experimentos de Southern blot se obtuvo mediante amplificación por PCR, para lo que se utilizaron los cebadores (Tabla 5) y ciclos indicados a continuación. La sonda permite diferenciar entre el alelo WT y el alelo tm1a, de manera que en las células ES WT hibridará con un fragmento de 9 kb y en las células ES que hayan incorporado la *cassette* transgénica de 16 kb.

Tabla 5. Nombre y secuencia de los cebadores empleados y utilizados para la síntesis de la sonda de hibridación empleada en el genotipado mediante transferencia Southern.

Cebadores	Secuencia 5'-3'
BstE-Fw	CTCAGCCACTCTGGAGACTTCGGC
BstE-Rv	GCTATGAGATAGTCATGGGAGCTGTC

El programa utilizado para la pareja de cebadores BstEII fue: 94ºC 3 min, seguido de 30 ciclos de 94ºC 15 s, 65ºC 20 s y 1 min a 72ºC y un último ciclo de 72ºC 5 min. El tamaño del fragmento amplificado fue de 702 pb.

La DNA polimerasa empleada para generar por PCR la sonda de hibridación fue la enzima Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech), que introduce una adenina

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

en el extremo 3' amplificado, lo que facilita la posterior subclonación en el plásmido pGEMT (pGEM-T Easy Vector, Promega), para lo que se siguió el protocolo recomendado por el fabricante. Esto permitió obtener y purificar nueva sonda sin necesidad de preparaciones de DNA genómico, evitando posibles amplificaciones espurias.

4.2.4.c Marcaje radiactivo de la sonda de hibridación

Para el marcaje de la sonda de hibridación se empleó el sistema HighPrime (Roche), basado en la síntesis de una cadena complementaria de DNA utilizando cebadores hexanucleótidos, en presencia del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I. Aproximadamente 30 ng de sonda de DNA (a una concentración de 5 ng/µl) se llevaron hasta un volumen de 14 µl. La muestra se desnaturalizó a 95ºC durante 10 min y se puso en hielo. Se añadieron 4 µl del High Prime kit, y 5 µl de [α-^{32}P]-dCTP (3000Ci/mmol, 10 mCi/ml, 500 µCi, Perkin Elmer) y se incubó durante 1 h a 37ºC. La reacción se paró con 2 µl de 0.2 M EDTA, añadiendo seguidamente TE hasta completar 100 µl. Para eliminar el exceso de desoxinucleótido trifosfato radiactivo no incorporado en el DNA, la muestra se pasó por una columna de filtración en gel Sephadex G-50 preparada en jeringuillas de insulina de 1 ml, equilibrada previamente con tampón TE, la cual se centrifugó posteriormente a 1.500 rpm (Centromix P-Selecta) durante 3 min. Todas las manipulaciones que involucraron manejo de compuestos radiactivos, con fuerte poder de emisión de partículas β, se realizaron en las instalaciones de radioisótopos del SCAI.

4.2.4.d Hibridación, lavado y exposición de la membrana

Las membranas de nylon se incubaron en rotación a 65ºC durante un mínimo de una hora en solución de prehibridación: 5x SSC, 1% SDS, 5x Denhardt's (véase Anexo I) y 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado (D1626, Sigma). El volumen empleado dependió del tamaño de la membrana, teniendo en cuenta que ésta debe ser cubierta por completo. Trascurrido este tiempo, se cambió la solución por la de hibridación (5x SSC, 1% SDS y 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado) junto con la sonda radiactiva,

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

previamente desnaturalizada, a una concentración final de $1x10^6$ cpm/ml. La hibridación se realizó en rotación a 65ºC O/N.

Tras la hibridación las membranas se lavaron a RT con disoluciones de astringencia creciente; 2x SSC y 0.1% SDS durante 10 minutos, tras los cuales se cambió el medio repitiéndose el lavado durante otros 10 min adicionales. A continuación el medio se cambió por 0.2x SSC y 01% SDS y se lavó de la misma forma descrita anteriormente, primero a RT y luego a 42ºC. Por último, se realizó un lavado con 0.1x SSC y 0.1% SDS a 65ºC. Tras secar las membranas se envolvieron con un plástico transparente y se dejaron 24 h en un casete de autorradiografía junto a una IP fotosensible. Este revelado rápido (en un aparato Fujifilm FLA 7000) nos permitió valorar si la membrana presentaba fondo y la intensidad del marcaje, previo a su exposición en películas Amersham Hyperfilm™ ECL que se dispusieron junto con dos pantallas intensificadoras en casetes metálicas y se mantuvieron a -80ºC durante 3 días de exposición.

5. Microinyección de células ES murinas transgénicas en embriones en estadio de 8 células

Estos experimentos se llevaron a cabo en el INIA (Madrid) de acuerdo con los protocolos implementados de Institución Interna de Cuidado Animal y Comité de Uso del INIA (Madrid).

5.1 Superovulación de ratones Swiss

Para la obtención de los embriones se superovularon ratones Swiss hembra, vía intraperitoneal con gonadotropina coriónica equina (PMSG o eCG; Intervet, Boxmeer) a una concentración de 7.5 UI, y 48 h más tarde, con gonadotropina coriónica humana (hCG, Farma-Lepori) a una concentración final de 5 UI.

Tras la inyección de la hCG se produce el pico de hormona luteinizante (LH) momento en el que se lleva a cabo el cruce con los machos. Los embriones en estadio de 8 células se extrajeron quirúrgicamente a los 2.5 días *post coitum* (dpc).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

5.2 Obtención de embriones de ratones Swiss

Para la obtención de los embriones, los animales se sacrificaron por dislocación cervical. El animal se situó en posición decúbito supino, de tal forma que su región abdominal quedará accesible para su manipulación. Se realizó un corte de 1 cm aproximadamente en la zona de la línea alba, y se rasgó la piel y la musculatura para acceder al aparato genital.

Se extrajeron los ovarios, oviductos y cuerno uterino, intentado eliminar la mayor parte de grasa y tejido conectivo, y se transfirieron a una placa para proceder a su lavado. Bajo estereomicroscopio se introdujo una jeringuilla con medio M2 (M7167, Sigma) a través del infundíbulo y los embriones liberados se recogieron y se lavaron con tres pases por placas de medio M2.

5.3 Microinyección de las células ES murinas transgénicas

5.3.1 Descongelación de células ES murinas transgénicas

Las células ES murinas transgénicas, identificadas mediante genotipado por PCR, se descongelaron a 37 ºC y se dispusieron en placas de 24 pocillos sobre MEF inactivados. Cuando alcanzaron la densidad celular apropiada se expandieron a placas P35, según el protocolo convencional. Se dejaron crecer hasta que alcanzaron el 70% de confluencia, momento en el que se procedió a su microinyección en embriones de 8 células.

5.3.2 Microinyección de las células ES murinas transgénicas en embriones en estadio de 8 células

Se cambió el medio a las ES murinas 1.5 horas antes de recogerlas, lo que permite su activación y facilita su contribución a la ICM. A continuación, se recogieron y el precipitado se resuspendió en 450 µl de medio M2 filtrado y se incubó en hielo, lo que tersa la membrana celular y facilita la inyección.

Cada embrión se inyectó con aproximadamente 10 células ES transgénicas. La microinyección se llevó a cabo con un micromanipulador mecánico (Leica DMi8). Posteriormente, los embriones se cultivaron en gotas de 40 µl de medio

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

optimizado KSOM (Specialty Media, Millipore) suplementado con aminoácidos y 4% de medio ES. Se cubrieron con aceite mineral y se mantuvieron 24 horas a 37ºC y 5% CO_2.

6. Transferencia de los embriones microinyectados con células ES transgénicas a ratones

Las hembras receptoras deben estar en pseudogestación, para lo que previamente a la transferencia se deben cruzar con machos vasectomizados. Tras anestesiar a los animales, se disponen en posición decúbito supino prono y se realiza una incisión de 1 cm aproximadamente a un centímetro del raquis (a nivel de la última costilla). Localizando la región en la que se sitúa el ovario, se realiza un corte en la capa muscular, tirando de la grasa que rodea a esta región se extrae el ovario. La grasa se inmoviliza con unas pinzas dejando accesible de esta forma el oviducto y la región del cuerno uterino.

Se transfirieron de 20 a 40 embriones por animal en medio M2 suplementando con 2% de FBS. La transferencia se realizó bajo estereomicroscopio a través del infundíbulo. Por último, se vuelve a introducir el ovario en el interior de la cavidad abdominal, se cose la musculatura y se grapa la piel.

Como resultado se obtuvieron crías quiméricas de pelaje negro y blanco, como consecuencia de las cepas murinas utilizadas, células ES provenientes de la estirpe B6D2 (negro) y embriones de hembras Swiss (blanco). Dichas crías se clasificaron en 6 niveles, según el grado de quimerismo que presentaban, asignado de la siguiente manera: aquellos animales que eran completamente blancos se les dio un nivel 0; el nivel 1 corresponde a un 25% de pelaje negro; nivel 2 hasta un 50%; nivel 3 si tiene ¾ partes del pelaje negro; nivel 4 hasta el 99% y por último un nivel 5, si al momento de nacer se le ven los ojos negros, indicado un 100% de quimerismo (niveles establecidos por el INIA). Normalmente los niveles 4 y 5 transmiten a la descendencia, ya que las células ES mutantes han contribuido a la línea germinal.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

7. Genotipado de ratones

Cuando se obtuvieron las crías quiméricas se cruzaron con ratones Swiss para comprobar si las células ES transgénicas transferidas habían contribuido a la línea germinal. De este cruce se obtuvieron crías negras, lo que confirmó este hecho, estableciéndose la colonia heterocigota fundadora.

Se realizó un nuevo genotipado mediante PCR para asegurar la presencia de la *cassette* transgénica en los ratones. Para ello, cuando las crías tenían entre 7 y 10 días de edad, se procedió a la amputación de una de las falanges. Para dicho proceso, se sacó a la camada entera del nido y se dispuso en otra jaula con un nuevo nido. A cada una de las crías se les aplicó anestesia local (Emla, Astra Zeneca), que se dejó actuar durante unos minutos antes del corte. Se utilizaron tijeras de microcirugía esterilizadas con etanol para realizar cada corte. Este procedimiento permitió marcar a cada uno de los animales tal como se indica en la Fig. 3. Las muestras se mantuvieron a -20ºC hasta su posterior procesamiento.

Para la extracción de DNA se añadieron 25 µl de tampón de extracción (STES; véase Anexo I) y 2.5 µl de proteinasa K (stock a 20 mg/ml). Se incubaron a 55ºC O/N, y a la mañana siguiente, se les añadió 150 µl de agua a cada una de ellas, se agitaron con vórtex y se centrifugaron 2 min a 13.000 rpm (Hettich Universal 320R, rotor 1420). Los cebadores (Tabla 6) y condiciones utilizadas se describen a continuación.

Figura 3. Representación del sistema de marcaje utilizado. Este sistema permite, además de la obtención de muestras para el posterior genotipado, marcar a las crías para su identificación.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tabla 6. Nombre y secuencia de los cebadores utilizados para genotipar las crías heterocigotas.

Cebadores	Secuencia 5'-3'
Int1-FW	TCCACCTGAGTGAGGTAGACATCC
Int1-RV	ACCATCTGGCAGGTTCTGTGATCC
LaR3-RV	CAACGGGTTCTTCTGTTAGTCC

Se emplearon dos cebadores antisentido, uno de ellos complementario a la *cassette* transgénica y otro al DNA genómico de ratón, y un cebador sentido complementario del DNA genómico. Los ratones heterocigotos (*Gls2*$^{tm1a/+}$) presentarán dos bandas, una de 270 pb (resultado de la amplificación de Int-Fw y Lar3-Rv) y otra de 432 pb (Int1-Fw e Int1-Rv) y los ratones WT sólo presentarán la banda correspondiente al DNA no modificado (432 pb). Esta PCR se analizó tanto con los cebadores por separado como con los tres cebadores simultáneamente, para asegurar la eficacia de la estrategia de tres cebadores conjuntos.

El programa de PCR utilizado fue: 94ºC durante 5 min; 30 ciclos de 94ºC 50 s, 63ºC 30 s y 1 min de extensión a 72ºC. Finalmente, se añadieron 10 min a 72ºC.

8. Análisis de viabilidad de los ratones homocigotos *Gls2*$^{tm1a/tm1a}$

Una vez se obtuvieron y validaron por PCR los ratones heterocigotos (*Gls2*$^{tm1a/+}$) se cruzaron entre sí para la obtención de homocigotos (*Gls2*$^{tm1a/tm1a}$). Aunque estos cruces se llevaron a cabo durante varios meses, no se observó ni la presencia de homocigotos ni la disminución de la camada, lo que nos llevó a pensar que los animales homocigotos no deberían ser viables. Para comprobar este hecho se llevaron a cabo estudios de viabilidad fetal. Tras registrarse el día de tapón vaginal, los embriones se dejaron desarrollar *in vivo* hasta los días 10, 12 y 14 *dpc*, donde se analizaron el número de posibles reabsorciones fetales. De igual forma, los fetos fueron extraídos y su DNA se analizó por PCR.

Así mismo, se realizaron estudios en blastocistos de hembras superovuladas (las hormonas se inyectaron con el mismo patrón que se ha descrito anteriormente). La obtención de los embriones se realizó bajo estereomicroscopio y se dispusieron en 10 µl de tampón: 50 mM KCl, 10 mM Tris (pH 8.3), 2.5 mM

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

$MgCl_2$, gelatina 0.1 mg/ml, 0.45% NP-40 y 0.45% Tween-20, con proteinasa K a una concentración de 0.1 mg/ml (Scavizzi *et al.,* 2015). Se incubaron a 55ºC durante 30 min y, posteriormente, se inactivó la acción de la proteinasa K elevando la temperatura a 95ºC durante 10 min.

9. Cruce de la colonia *Gls2*$^{tm1a/+}$ generada con animales que expresan la Flp recombinasa

Considerando la posible letalidad de los ratones homocigotos *Gls2*$^{tm1a/tm1a}$, se procedió a eliminar la región comprendida entre los sitios FRT (que incluye la trampa génica y la *cassette* Neo) mediante el cruce de los ratones heterocigotos *Gls2*$^{tm1a/+}$ con ratones que expresan la recombinasa Flp, para lo que previamente, se establecieron dichas colonias de animales.

Los cebadores utilizados para genotipar los ratones que expresan la recombinasa FlpE y su ciclo de PCR se muestran a continuación:

Tabla 7. Nombre y secuencia de los cebadores utilizados para genotipar por PCR la colonia de ratones FlpE.

Cebadores	Secuencia 5'-3'
FlpE-FW	CTAATGTTGTGGGAAATTGGAGC
FlpE-RV	CTCGAGGATAACTTGTTTATTGC

El programa utilizado para realizar esta PCR consiste en: 94ºC 5 min, seguido de 30 ciclos de 94ºC 50 s; 60ºC 30 s y 72ºC 1 min. Se adicionó un ciclo final de extensión de 10 min a 72ºC. El tamaño esperado de amplificación del transgén es de 600 pb.

Los ratones que expresan la recombinasa FlpO se genotiparon con los cebadores indicados en la Tabla 8. Finalmente, y como consecuencia de la mayor eficacia que presentaban estos ratones en la escisión de la *cassette* transgénica, fueron los ratones utilizados para establecer la colonia *Gls2*$^{tm1c/+}$.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tabla 8. Nombre y secuencia de los cebadores utilizados para genotipar por PCR la colonia de ratones FlpO.

Cebadores	Secuencia 5'-3'
FlpO-FW	GCTATCGAATTCCACCATGGCTCCTAAGAAGAA
FlpO-RV	CAATGCGATGAATTCTCAGATCCGCCTGTTGATGTA

Las condiciones del programa de PCR fueron: 94ºC 5 min, seguido de 35 ciclos de 94ºC 30 s; 65ºC 30 s y 72ºC 1 min. Se adicionó un ciclo final de extensión de 5 min a 72ºC. El tamaño esperado de amplificación del transgén es de 1239 pb.

10. Cruce de la colonia *Gls2*$^{tm1c/tm1c}$ con animales que expresan la Cre recombinasa

Una vez se obtengan los animales homocigotos *Gls2*$^{tm1c/tm1c}$ se cruzarán con ratones que expresan la recombinasa Cre bajo un promotor específico de cerebro (promotor de sinapsina de rata). Actualmente se ha establecido una colonia de estos animales, adquiridos en Jackson Laboratory. Los cebadores y el ciclo de amplificación para su genotipado se muestran a continuación.

Tabla 9. Nombre y secuencia de los cebadores utilizados para genotipar por PCR la colonia de ratones que expresan la recombinasa Cre.

Cebadores	Secuencia 5'-3'
Cre-FW	GCGGTCTGGCAGTAAAAACTATC
Cre-RV	GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT

El programa utilizado consiste en: 94ºC 3 min, seguido de 35 ciclos de 94ºC 30 s, 51.7 ºC 1 min y 72ºC 1 min y, un último ciclo de 72ºC 2 min. El tamaño del fragmento amplificado fue de 100 pb.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

ANÁLISIS FENOTÍPICO MOLECULAR DE MODELOS MURINOS TRANSGÉNICOS

1. Análisis de los transcritos GA mediante qRT-PCR

1.1 Cuantificación de los transcritos GLS2 en animales WT, *Gls2*$^{tm1a/+}$ y *Gls2*$^{tm1c/+}$

El mRNA se aisló siguiendo las recomendaciones del fabricante (AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit, QUIAGEN), a partir de no más de 30 mg de cerebro e hígado de animales *Gls2*$^{tm1a/+}$, WT y *Gls2*$^{tm1c/+}$ (6 animales por genotipo).

La cuantificación del RNA se llevo a cabo con espectofotómetro y la calidad del RNA se comprobó mediante gel desnaturalizante al 1.5 % (p/v) de agarosa/formaldehido (véase Anexo I). La integridad del RNA se valoró tras observar las bandas correspondientes a los RNA ribosómicos, 28S y 18S, que aparecen aproximadamente en un ratio 2:1 de intensidad.

Muestras de 1 ug de RNA se retrotranscribieron a cDNA siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (QuantiTect Reverse Transcription Kit, Quiagen). A continuación, se realizó la PCR a tiempo real con el kit Perfecta SYBR-Green Supermix (Quanta Biosciences), incluyendo los controles negativos correspondientes: control de la retrotranscripción (valora la contaminación de DNA genómico) y control sin RNA molde (contaminación por reactivos y aerosoles).

Los cebadores y condiciones del ciclo empleados fueron los descritos anteriormente por Martín-Rufián *et al.*, 2012. Se realizaron curvas estándar a partir de concentraciones conocidas de RNA para, posteriormente, representar el logaritmo de la concentración (ng) frente al valor C_t (*cycle threshold*). La pendiente de las muestras (*slope*) permitió calcular la eficiencia de amplificación (E) mediante la siguiente fórmula: % Eficiencia = (E-1) × 100; donde E se calcula como, $E = 10^{-1/slope}$.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tabla 10. Secuencia de los cebadores empleados en qRT-PCR (Martín-Rufián *et al.,* 2012).

Cebadores	Secuencia 5'-3'	Secuencia 3'-5'	pb
GAB	GCACTCGGATCATGACGCCTCAC	TTGGACCATGCGCTGCATCTTG	190
LGA	GCCAGATGGTTCAAAGAGGAGG	GTGGTGAACTTGTGGATAGGG	230
β-actina	CTTTGCAGCTCCTTCGTTGCC	GCGAAGCCGGCTTTGCACAT	111

Las condiciones del programa utilizado fueron: 95ºC durante 4 min, 40 ciclos de 95ºC 15 s, 61ºC 45 s y 72ºC 30 s. Las medidas de fluorescencia se realizaron a 72ºC. El software para analizar los resultados fue CFX de Bio-Rad.

La expresión relativa de cada una de las isoformas se calculó en base al método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001), normalizando los resultados frente a β-actina.

Los amplicones fueron analizados en geles de agarosa, para confirmar igualmente la presencia de un único producto de amplificación y la ausencia de dímeros y/o contaminación por DNA genómico.

1.2 Cuantificación del transcrito KGA en animales KOLPA$_1$

Los animales fueron sacrificados por decapitación y una vez extraído el cerebro, éste se congeló rápidamente a -80ºC hasta la obtención de las diferentes regiones de interés. Se realizaron cortes de 2 mm de grosor con una matriz Zivic de cerebro (Zivic Instruments). Siguiendo las indicaciones del *Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (Paxinos and Franklin 2001) y Blanco *et al*[2]*.,* 2012, se aislaron las regiones de interés, correspondientes a estriado, hipocampo, corteza prefrontal (PFC), parietal motora (PM) y cerebelo.

La extracción de RNA y la retrotranscripción se llevaron a cabo como se describe en el apartado anterior. Los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 11. Las condiciones del programa utilizado fueron las mismas que para los transcritos GLS2.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tabla 11. Secuencia de los cebadores empleados en qRT-PCR (Martín-Rufián *et al.,* 2012)

Nombre	Secuencia 5'-3'	Secuencia 3'-5'	pb
KGA	CAGAACAGCCCTGCATGTTGCTG	CCACCTGTCCTTGGGGAAGGGGT	179

Para la cuantificación absoluta del transcrito KGA, se realizaron curvas estándar empleando cantidades conocidas de cada uno de los amplicones específicos. Dichos amplicones fueron obtenidos previa amplificación por PCR, separados y purificados de geles de agarosa al 2%. Las concentraciones se estimaron por espectofotometría. A continuación, se hicieron diluciones de cada estándar (1/10) y para cada una de ella se determinó el C_t. La curva se obtuvo representando el C_t de cada dilución frente al logaritmo de la cantidad inicial. Los resultados se obtuvieron interpolando en la curva, y se expresaron como número de moléculas de mRNA ± SEM por ng de RNA total. Finalmente, el número de copias se calculó teniendo en cuenta el número de Avogadro y la correspondiente masa molecular del mRNA (Sambrook *et al.,* 1989)

2. Análisis de expresión proteica por inmunotransferencia Western

2.1 Extracción y cuantificación de proteínas

La extracción de proteínas para el análisis de isoenzimas GA en animales WT, *Gls2*$^{tm1a/+}$ y *Gls2*$^{tm1c/+}$ (n=6 por genotipo), se llevó a cabo en frío mediante homogenización del tejido en un tampón de extracción (a razón de tres volúmenes de tampón por peso de tejido), compuesto por: Tritón X-100 1% (p/v), 2mM EDTA, 50 mM Tris (pH 8) e inhibidores de proteasas (*Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail*, Roche). A continuación, se incubó a 4ºC durante 1 h en agitación y se centrifugó a 14.000 rpm (Hettich Universal 320R, rotor 1420) durante 15 min a 4ºC.

La cuantificación de proteínas en el sobrenadante se estimó mediante el método de Bradford (1976). Para lo cual se llevó a cabo una interpolación sobre una recta patrón realizada con concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA, Fraction V, Sigma). Las absorbancias se midieron a 595 nm (Microplate Reader 680, Bio-Rad).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

En animales $KOLPA_1$ se analizaron marcadores proteicos de espinas dendríticas: PSD-95 y sinaptofisina (n=5 por genotipo), KGA (n=9 por genotipo) y MMP-9 pro-activa y activa (n= 8 WT; n= 11 $KOLPA_1$). Los animales fueron sacrificados por decapitación y se les extrajo el cerebro y antes de su congelación a -80ºC, se diseccionaron las dos áreas de estudio: corteza e hipocampo.

La extracción de proteínas para el análisis de marcadores proteicos de espinas dendríticas (PSD-95 y sinaptofisina) y KGA, se llevó a cabo mediante homogenización con tampón RIPA (150 mM cloruro sódico, 1% NP-40, 0.25% sodio deoxicolato, 0.1% SDS, 1 mM EGTA y 50 mM Tris pH 7.4 e inhibidores de proteasas), que resulta óptimo para la extracción de proteínas de membrana. La homogenización del tejido en el tampón de extracción se realizó en hielo, la incubación a 4ºC se mantuvo 20 minutos y posteriormente se centrifugó 20 minutos a 30.000g. En el caso de MMP-9 las muestras se homogeneizaron en 20 volúmenes de tampón de lisis (50 mM Tris, pH 7,4, 100 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 1 % NP-40) conteniendo inhibidores de proteasas al 5 % y fosfatasas al 1 % (p5726, Sigma, Madrid, España). La muestra se hizo pasar a través de la aguja de una jeringa hipodérmica (26G) para romper las fracciones tisulares que permanecieron enteras.

La determinación de la concentración de proteína de las muestras en tampón de homogenización conteniendo Nonidet P40 se realizó mediante una modificación del método de Lowry (Markwell *et al.,* 1978). Para ello se mezclaron 200 μL de una dilución de la muestra con 600 μL de reactivo C, compuesto por una mezcla en proporción 100:1 de reactivo A (2% Na_2CO_3, 0.4% NaOH, 0,16% tartrato sódico y 1% SDS) con sulfato de cobre al 4% (reactivo B). La mezcla se incubó durante 10 min a RT. A continuación se adicionaron 60 μl de reactivo de Folin-Ciocalteau (diluido en agua a razón 1:1). Tras 45 minutos de incubación, se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 660 nm (Microplate Reader 680, Bio-Rad) de cada muestra y se interpoló este valor en una recta patrón realizada a partir de concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.2 Inmunotransferencia Western

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes en presencia de SDS, según el método descrito por Laemmli (1970). Para ello se emplearon 45 µg de proteínas procedentes de tejido cerebral y 30 µg de proteínas hepáticas. Las muestras se calentaron durante 5 min a 95ºC en tampón de carga (véase Anexo I) y se analizaron en geles de poliacrilamida al 10%. El marcador utilizado fue el *Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS* (GE Healthcare).

Posteriormente, se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa empleando el Mini Trans-Blot cell (Bio-Rad) durante 1 h a 100V. Finalizada la transferencia, la membrana se tiñó con Red Ponceau para asegurar que las proteínas se habían transferido correctamente. El exceso de tinción se eliminó con agua.

El procedimiento para la incubación de los anticuerpos fue el mismo para todas las muestras. Las membranas se bloquearon con BSA al 5% en tampón TTBS (Anexo I) durante 1 h a RT. A continuación, los anticuerpos primarios se incubaron en agitación suave a 4ºC (O/N). A la mañana siguiente se lavó la membrana tres veces durante 10 min con TTBS y se añadió el anticuerpo secundario correspondiente, el cual se dejó durante 1 h a RT. Después de lavar la membrana, se reveló con el reactivo quimioluminiscente *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (ThermoFisher) y la imagen se registró en un equipo de fotodocumentación de geles y membranas (ChemiDoc MP System, Bio-Rad). Se retiró el excedente de reactivo quimioluminiscente y se añadió el anticuerpo anti-GAPDH o anti-β-actina como control de carga, y la membrana se dejó a 4ºC O/N. A la mañana siguiente se procedió de forma equivalente a la descrita para la incubación del anticuerpo secundario.

La cuantificación de la densidad de las bandas se realizó utilizando el programa Image J. El valor de cada muestra se normalizó en referencia a la inmunoreactividad de la β-actina o GAPDH según corresponda.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tabla 12. Anticuerpos y diluciones utilizadas en los experimentos de inmunotransferencia Western con animales WT, *Gl2*$^{tm1a/+}$, *Gls2*$^{tm1c/+}$ y KOLPA$_{1.}$

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
GAB	1:500	Anti-IgG de ratón	1:40.000
PSD-95	1 µg/ml	Anti-IgG de cabra	1:80.000
Syn	1:2.500	Anti-IgG de conejo	1:80.000
KGA	1:1.000	Anti-IgG de conejo	1:80.000
MMP-9	1:1.000	Anti-IgG de conejo	1:80.000
GAPDH	1:500	Anti-IgG de ratón	1:40.000
β-actina	1:10.000	Anti-IgG de ratón	1:40.000

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anticuerpo anti-GAB y anti-KGA, previamente desarrollados y caracterizados en este laboratorio (Olalla *et al*. 2002; Campos *et al*. 2003; Olalla *et al*. 2008; Cardona *et al*. 2012); PSD-95 (12093, Abcam); Syn (14692, Abcam); MMP-9 (19016, Millipore); GAPDH (9484, Abcam); β-actina (A5441, Sigma). Los anticuerpos secundarios (conjugados a peroxidasa de rábano, HRP) utilizados fueron: Anti-IgG de ratón (A9044, Sigma); Anti-IgG de cabra (ab5420, Abcam); Anti-IgG de conejo (A0545, Sigma).

3. Análisis de expresión de isoenzimas GA mediante cuantificación de la actividad enzimática

La actividad GA se llevó a cabo por el método OPA (o-ftalaldehído) descrito por Heini *et al.* (1987) y basado en la determinación del amonio producido por la enzima GA al actuar sobre su sustrato y posterior reacción del mismo con el OPA. La actividad específica se expresó en unidades internacionales de actividad enzimática (U, cantidad de enzima que cataliza la producción de 1 µmol de producto por minuto) por gramo de proteína.

El tejido se homogenizó empleando tres volúmenes de tampón de reacción: 25 mM Tris–HCl (pH 8), 0.2 mM EDTA, 0.33 M sacarosa, inhibidores de proteasas (Roche) y detergente no iónico Tritón X-100 1% (p/v). Se centrifugó a 100.000g (Optima TL Ultracentrífuga) durante 30 min a 4ºC.

La reacción GA se llevó a cabo durante 1 h a 37ºC tras añadir 25 µL de muestra a 35 µL de tampón de reacción. La reacción se paró con 10 µL de ácido

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

tricloroacético (TCA) al 10% (p/v), se mantuvo en hielo durante 15 min y se centrifugó a 12.000 g 5 min. Para los blancos de la reacción, las muestras y el sustrato se incubaron por separado y, previo a la adición de TCA, se mezclaron. Para la medida del amonio se utilizaron 5 µL del sobrenadante que se mezclaron con 150 µL de reactivo OPA (10 mL de fosfato potásico 0.2 M, pH 7.4; 0.56 mL de mercaptoetanol 72 mM en etanol; y 0.56 mL de OPA 186 mM). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 45 minutos en oscuridad y se midió la absorbancia a 410 nm (Microplate Reader 680, Bio-Rad). Las concentraciones de amonio de las muestras se extrapolaron en una recta patrón de NH_4Cl.

Para la cuantificación de la actividad GA en ratones WT, *Gls2*$^{tm1a/+}$ y *Gls2*$^{tm1c/+}$, se utilizaron 6 animales por genotipo. Se llevaron a cabo dos tipos de ensayos de actividad basándose en las distintas propiedades cinéticas de las isoenzimas KGA y GLS2 (GAB/LGA). Se cuantificó la actividad total GA, utilizando como tampón de reacción 150 mM fosfato potásico pH 8, 171 mM L-Gln y 1 mM NH_4Cl. La actividad asociada a GLS2 se midió con un tampón 50 mM fosfato potásico pH 8, 100 mM L-Gln, 100 mM ácido glutámico y 1 mM NH_4Cl, tal y como está descrito en Campos-Sandoval *et al.*, 2007.

La cuantificación de actividad GA en animales $KOLPA_1$ se realizó en las siguientes regiones cerebrales: corteza PM (WT n= 9; $KOLPA_1$ n= 5), PFC (WT n= 12; $KOLPA_1$ n= 8), hipocampo (WT n= 16; $KOLPA_1$ n= 12), estriado, giro dentado y cerebelo (en estas regiones el número de animales analizados estuvo comprendido entre 8 y 15 para ambos genotipos).

4. Inmunohistoquímica de isoformas GA en animales $KOLPA_1$

Para el análisis inmohistoquímico de los animales $KOLPA_1$, un total de 8 ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg) y perfundidos transcardialmente con 0.1 M PBS (pH 7.4), seguido de solución de fijación fría (4% paraformaldehído, 75 mM lisina y 10 mM de metaperiodato sódico, en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4). El tejido se dejó O/N a 4ºC en solución de fijación y posteriormente se sumergió en sacarosa al 30%. Los cortes de 40 µm se realizaron

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

con un micrótomo de congelación (Leica, modelo CM 1325) y se guardaron en PBS con azida sódica al 0.02%.

La actividad peroxidasa endógena se inactivó con una disolución del 3% de H_2O_2 y 10% de metanol en tampón 0.1M PBS (pH 7.4) durante 20 minutos a RT. A continuación el tejido se lavó durante 1 hora en tampón PBS y se procedió a la inactivación de la biotina y avidina endógenas, así como las proteínas de unión a biotina mediante la incubación de las secciones con el kit de bloqueo de Vector Labs (SP-2001) durante 30 minutos. Posteriormente, el tejido se incubó con los anticuerpos policlonales de conejo anti-KGA y anti-GAB, desarrollados y caracterizados en nuestro laboratorio. El anticuerpo anti-KGA se utilizó a una dilución 1:1000, y el anti-GAB a 1:500. Ambas incubaciones se prolongaron 48 h a RT. Tras realizar tres lavados de 10 min con PBS se añadió el anticuerpo secundario biotinilado, anti-IgG de conejo (Vector Labs) a 1:500 (en PBS con 0.3% Tritón X-100 y 0.1% azida sódica) y se dejó incubado durante 1 h RT. Tras realizar varios lavados con PBS se incubó con extravidina acoplada a peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich) a 1:2000 durante 1 h a RT. El revelado se llevó a cabo empleando tetrahidrocloruro 3-3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma) al 0.05% (p/v) y 0.03% (p/v) sulfato amónico de níquel en H_2O_2 al 0.01% (v/v) en PBS. Los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados, que posteriormente fueron deshidratados en graduación creciente de etanol, se aclararon con xileno y cubrieron con medio DPX (VWR International, BDH Prolabo).

Como control negativo de la técnica se utilizaron secciones que no habían sido incubadas con anticuerpo primario.

Para la adquisición de las imágenes se utilizó un microscopio Nikon Eclipse 80i acoplado a una cámara Nikon DS-5M de alta resolución.

5. Caracterización de la morfología de espinas dendríticas en ratones KOLPA$_1$

La tinción de Golgi-Cox (FD Rapid GolgiStain™ kit; *FD Neurotechnologies*) se llevó a cabo para detectar las alteraciones morfológicas de las dendritas y de las espinas dendríticas. Para ello, ratones macho adultos de cada uno de los genotipos

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

estudiados, WT (n=5) y KOLPA$_1$ (n=5), fueron anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg) e inmediatamente se les extrajeron los cerebros. El tejido se lavó con agua destilada y se sumergió en solución de fijación (A+B) durante dos semanas en oscuridad. Posteriormente, los cerebros se transfirieron a la solución C durante 4 días. El tejido se congeló en isopentano (enfriado a -70ºC) y se cortó en un microtomo de congelación (Leica, CM 1325) en secciones de 150 µm. Los cortes se montaron en la solución C en portas gelatinizados y se dejaron secar a RT. Para la tinción de las muestras se siguió el protocolo recomendado por el fabricante, seguido de un proceso de deshidratación en etanol en graduación creciente, aclarado con xileno y montaje con medio DPX (BDH).

Para la adquisición de las microfotografías de las dendritas basales piramidales de la región CA1 (*stratum oriens*) de hipocampo, se utilizó un microscopio SP5 II (Leica) y un objetivo de inmersión en aceite 63x (láser 405 diodo), con un zoom 2.5x (z-stack 0.3 µm). Para la cuantificación y el análisis morfológico se utilizó el software LAS AF Lite (Leica). Se analizaron tanto la densidad de las espinas dendríticas (valorado como el número de espinas en 10 µm de longitud) en dendritas secundarias y terciarias (analizándose un total de 30 dendritas por genotipo), como su morfología y longitud (evaluando un total aproximado de 120 espinas/genotipo), y el ancho de la dendrita. Se siguieron los siguientes criterios: 1) la calidad de la tinción; 2) el aislamiento de las dendritas analizadas; 3) espinas claramente distinguibles. El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa Statgraphics usando la prueba t de Student o el test no paramétrico de Mann-Whitney.

6. Análisis por zimografía en gel para la determinación de la actividad enzimática

6.1 Determinación de la actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9

La determinación de la actividad gelatinasa se llevó a cabo sobre las mismas muestras utilizadas para el estudio de la expresión proteica, por lo que el protocolo de obtención y homogenización, así como la determinación de la concentración de proteína total se encuentran detallados en el apartado anterior.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

La separación de MMP-2 y de MMP-9 se llevó a cabo mediante geles de poliacrilamida/bis-acrilamida al 7 %, conteniendo gelatina al 5 % como sustrato enzimático específico de dichas metaloproteinasas.

Las muestras fueron diluidas 3:1 en tampón de carga no reductor (25 mM Tris, pH 6,8, 10 % glicerol, azul de bromofenol) y se calentaron durante 15 min a 37 °C, cargándose 20 µg de cada una de las muestras. La electroforesis se desarrolló en condiciones de voltaje constante, a 120 V durante 110 min.

Tras la electroforesis, los geles se incubaron dos veces en tampón de lavado (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 6 mM $CaCl_2$, 1,5 µM $ZnCl_2$, 2,5% Tween-20) durante 30 min a fin de eliminar la unión reversible del SDS a las proteínas de las muestras, así como permitir la renaturalización de las proteínas y recuperar su actividad enzimática. Posteriormente, se incubaron los geles en tampón de activación (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 6 mM $CaCl_2$, 1,5 µM $ZnCl_2$) durante 48 h a 37°C. Tras la incubación, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250, Bio-Rad) y, posteriormente, se destiñieron con solución de ácido acético al 10% y metanol al 40%, lo que permitió visualizar bandas decoloradas debido a la ausencia de gelatina, correspondientes a la actividad enzimática de las gelatinasas ensayadas.

Los geles revelados de este modo fueron escaneados como negativos. La intensidad de las bandas correspondientes a la degradación de sustrato se cuantificó mediante el programa Image J Sofware.

6.2 Determinación de la actividad proteolítica del activador tisular del plasminógeno

El estudio de la actividad proteolítica del activador tisular del plasminógeno (tPA) se llevó a cabo mediante zimografía en geles de poliacrilamida/bis-acrilamida al 9 %, conteniendo caseína al 0,1 % y plasminógeno al 0,1 % como sustrato enzimático específico.

Las muestras se prepararon de igual manera que en el caso anterior con la diferencia de que se cargaron 10 µg de proteína total.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Los geles se lavaron dos veces durante 30 minutos en tampón de lavado (0,1 M Tris-HCl, pH 8, 0,1 M glicina, 0,01 M EDTA y 2,5 % Tween-20) y se incubaron en tampón de activación (0,1 M Tris-HCl, pH 8, 0,1 M glicina y 0,01 M EDTA) durante 48 h a 37°C. Tras la incubación, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie y a continuación, se destiñeron con una solución de ácido acético 10 % y metanol 20 % lo que permitió visualizar las bandas decoloradas, debido a la ausencia de caseína y plasminógeno, correspondientes a la actividad enzimática del tPA. El análisis de los geles se realizó de igual manera que para MMP-2 y MMP-9.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Resultados y Discusión

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

PARTE I: GENERACIÓN DE UN MODELO MURINO KO CONDICIONAL PARA *Gls2*

Uno de los objetivos de la investigación realizada es la obtención de ratones KO condicionales para el gen *Gls2* en cerebro. Para tal efecto se aquirió un vector de transgénesis del consorcio IMPC (EUCOMM), que se usó para transfectar células madre embrionarias (ES) murinas. El hecho de que al menos dos de las isoformas GA, KGA y GAC, se expresen desde el nacimiento del animal transgénico KO *Gls2* podría evitar la mortalidad perinatal. Esta aproximación experimental nos permitirá aclarar la función de la expresión conjunta de isoenzimas GA en cerebro, así como su función en dicho tejido. Un primer intento de obtener estos animales KO condicionales para *Gls2* realizado por nuestro grupo de investigación resultó infructuoso, debido a que la modificación no se incorporó a la línea germinal (Tosina, 2015).

1. Validación del vector de transgénesis

Para confirmar la integridad del vector de transgénesis, previo a su electroporación en células ES murinas, se llevó a cabo un análisis de restricción y se secuenció parcialmente.

Para el análisis de restricción se seleccionaron enzimas con varios puntos de corte dentro del vector, generándose fragmentos de diversos tamaños que posteriormente se resolvieron en un gel de agarosa. Concretamente, se optó por las enzimas *Eco*RV -que reconoce la secuencia GATATC- y *Sac*I, que lo hace en la secuencia GAGCTC. Mediante análisis de la secuencia diana, dedujimos que la digestión con *Eco*RV produciría 7 fragmentos teóricos, con los siguiente tamaños (en kb): 10.5; 4.1; 3.4; 2.8; 2.6; y 1.2, junto con un fragmento menor de 29 pb. En la siguiente figura se muestra una fotografía del gel de agarosa obtenido tras la digestión enzimática.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

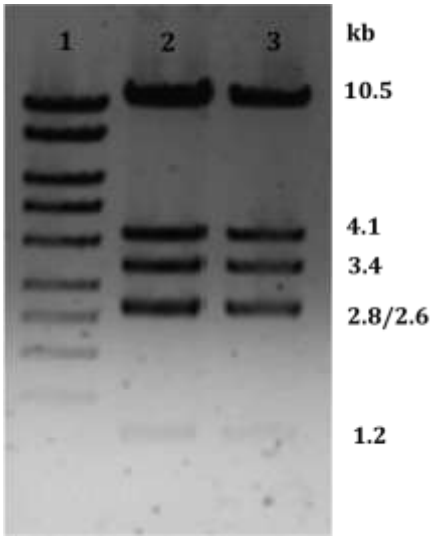


Figura 1. Análisis de restricción del vector de transgénesis con *EcoR*V. (1) Marcador de masa molecular *Mass Ruler High Range DNA Ladder*. (2 y 3) Ambas calles corresponden a dos digestiones de diferentes *Midipreps* del vector de transgénesis con la enzima *EcoR*V.

No fue posible resolver los fragmentos de 2.8 y 2.6 kb en el gel de agarosa, apareciendo como una única banda entre 2.5 y 3 kb, por lo que este análisis no puede confirmar, de forma inequívoca, la presencia de ambos; por este motivo, y para asegurar la integridad del vector, se realizó una nueva digestión con la enzima *Sac*I, que genera un patrón de corte diferente al anterior; concretamente, 6 fragmentos de los siguientes tamaños: 10.2, 5.6, 4.3, 2.5 y 1.3 kb, y uno menor de 750 pb.

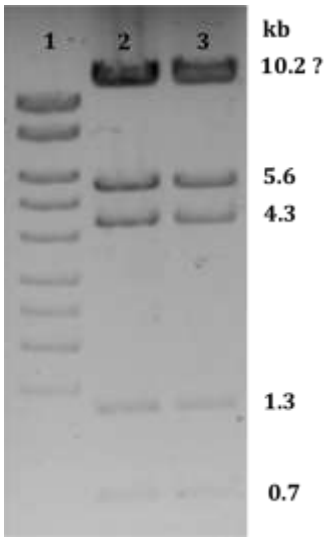


Figura 2. Análisis de restricción del vector de transgénesis con *Sac*I. (1) Marcador de masa molecular *Mass Ruler High Range DNA Ladder*. (2 y 3) Ambas calles corresponden a dos digestiones de diferentes *Midipreps* del vector de transgénesis con la enzima *Sac*I.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

De los fragmentos esperados no se observa el correspondiente a 2.5 kb; además, el fragmento de restricción de 10.2 kb aparece muy por encima de la banda de 10 kb del marcador, lo que sugiere una mayor masa molecular. Mediante el análisis de la secuencia proporcionada por el consorcio IMPC, se comprobó que los fragmentos *SacI* de 10.2 kb y 2.5 kb eran contiguos, por lo que la explicación más coherente al patrón de restricción mostrado en la Fig. 2 es que no se han generado los fragmentos de 10.2 kb y 2.5 kb probablemente debido a alguna mutación en la secuencia que afecte a la diana de restricción de la enzima *Sac*I. De igual manera, el fragmento de 2.8 kb generado por *EcoR*V y el de 2.5 kb de *Sac*I se corresponden a la misma región del vector de transgénesis, la zona del gen *lacZ*, por lo que esta región se secuenció con el cebador lacZFw para verificar su presencia y despejar dudas sobre su integridad.

Los resultados, adjuntos en el Anexo II, permiten confirmar la presencia de la región *lacZ*. Aunque la secuenciación no llegó a la diana de restricción de *EcoR*V, quedando unas 60 pb por delante, se corroboró que en la totalidad de los nucleótidos secuenciados no había ninguna modificación con respecto a la secuencia ofrecida por el consorcio IMPC. De igual manera, el análisis de la secuencia amplificada con los cebadores In2Fw (localizado en el intrón 2 de la secuencia genómica de *Gls2*) e In5Fw (hibrida con el intrón 5) permitieron analizar la región comprendida entre los sitios loxP.

En conclusión, la ausencia de los fragmentos de restricción *Sac*I de 10.2 kb y 2.5 kb puede deberse a una digestión parcial o incompleta, como consecuencia de un posible plegamiento en la zona de reconocimiento de la diana de restricción, apareciendo en lugar de una banda de 10 kb una de, aproximadamente, 12 kb, correspondiente a ambos fragmentos unidos. Por consiguiente, el análisis de restricción y secuenciación del vector de transgénesis confirmó su correcta estructura y secuencia.

2. Cultivo de las células madre embrionarias murinas

Las células ES, cuyo origen es la masa celular interna del blastocisto (ICM), se caracterizan por su capacidad de dividirse manteniendo un estado indiferenciado y por ser capaces de generar cualquiera de las tres capas

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo) (Nagy & Vintersten, 2006). Uno de los puntos críticos en el cultivo de células ES es mantener su estado pluripotente, ya que normalmente tienden a diferenciarse. Para conseguir este objetivo, es necesario el co-cultivo con MEF inactivados o STO (una línea de fibroblastos murinos transformados) y el factor inhibidor de la leucemia (LIF), una citoquina del tipo interleukina 6 (IL6) que inhibe la diferenciación celular (Evans & Kaufman, 1981).

El LIF ejerce su acción a través de gp130, una subunidad del receptor de citoquinas esencial en la transducción de señales. La cascada de activación implica a las quinasas Janus (JAKS) que fosforilan a STAT3, que actúa como un factor de transcripción activando genes que se encargan de potenciar la auto-renovación de las células ES (Hirano *et al.*, 2000). Aunque la función del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) es menos clara, parece que cuando se aportan señales extracelulares, como LIF, también promueve la activación de la vía JAK/STAT3 (Lanner & Rossant, 2010).

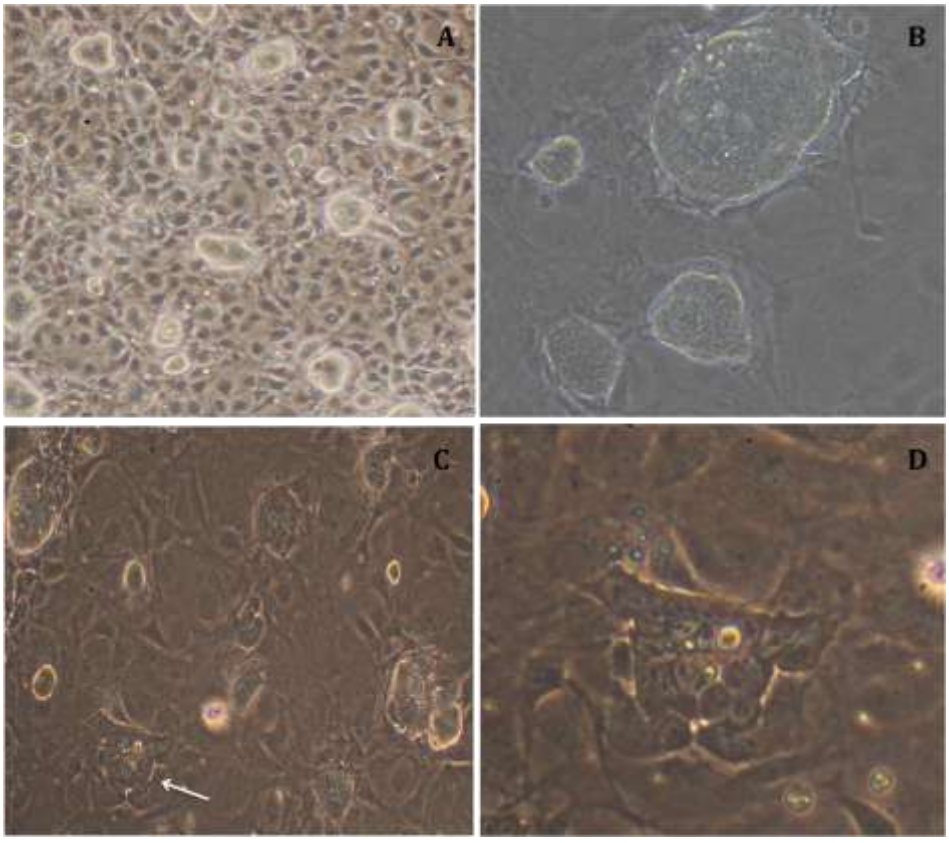


Figura 3. Cultivo de células madre embrionarias (ES) murinas. Las células ES crecen formando colonias redondeadas y compactas de pequeñas células, sobre una capa de fibroblastos

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

embrionarios de ratón (MEF). En la figura C, se indica con una flecha blanca una de las colonias diferenciadas, que se puede ver en aumento en la figura D. Se utilizó un microscopio Nikon Diaphot, con objetivo 4 x (A-C) y 10x (D).

3. Electroporación de células ES murinas con el vector de transgénesis

Previo a la electroporación de las células ES, se debe realizar una digestión enzimática que permita hacer lineal al vector de transgénesis, lo que favorecerá los eventos de reemplazamiento frente los de inserción, además de proteger el marcador de selección negativo de la acción de nucleasas (Cheah & Behringer, 2001). Para ello se seleccionó una enzima de restricción con un único punto de corte fuera de la zona de homología, concretamente se utilizó *Asi*SI. La banda única obtenida tras la digestión del vector, de aproximadamente 24 kb, coincide con el tamaño teórico esperado del vector lineal (Fig. 4).

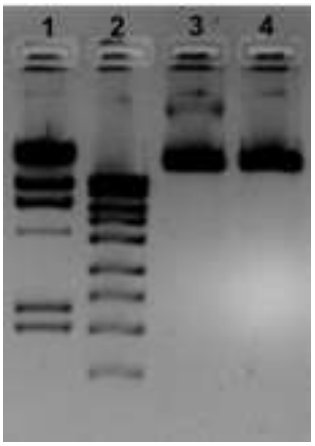


Figura 4. Análisis de restricción del vector de transgénesis con *AsiSI*. (1) Marcador *λHindIII*, (2) Marcador *Mass Ruler High Range DNA Ladder*. (3 y 4) Digestiones de diferentes *Midipreps* del vector de transgénesis con la enzima *Asi*SI.

4. Selección y genotipado de células ES murinas transgénicas

Los marcadores de selección permiten identificar aquellas células que han incorporado la *cassette* transgénica mediante la expresión de resistencia a antibióticos. El vector de transgénesis porta un gen *neo*^{r}, que codifica para la enzima aminoglucósido fosfotransferasa, confiriendo resistencia a antibióticos de la familia de los aminoglucósidos (geneticina, kanamicina, neomicina) que actúan inhibiendo la síntesis proteica (Hall *et al.,* 2009). Además, este vector de

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

transgénesis porta un marcador de selección negativa, el gen DTA (fragmento A de la toxina diftérica), que permite seleccionar los eventos de recombinación no homólogos, mediante la inhibición de la síntesis proteica en las células que lo incorporen (Yagi *et al.,* 1990).

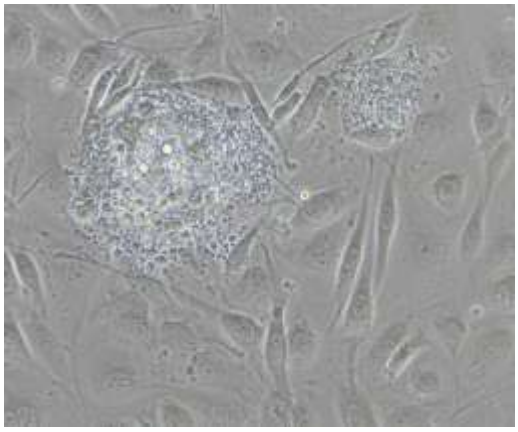


Figura 5. Selección de células ES murinas transgénicas con el antibiótico G418. La selección con geneticina se llevó a cabo durante 8 días, momento en el que ya se observaba muerte celular. Las células ES murinas resistentes al tratamiento se seleccionaron para su genotipado por PCR. En la imagen se muestra una colonia ES murina con gran número de vacuolas (objetivo 10x).

Para confirmar la presencia de la *cassette* transgénica en las células ES murinas resistentes a G418 se llevaron a cabo tres PCR, una en la región de homología 5', otra específica del gen *neo*^{r} y la tercera específica del brazo corto del vector (región 3'). Los cebadores In1-Fw y Lar3-Rv reconocen la secuencia comprendida entre el intrón 1 y la secuencia En2SA (Fig. 6), lo que permite asegurar la presencia de la *cassette* transgénica, ya que el cebador antisentido es específico de esta región. Los cebadores Neo-Fw y Neo-Rv amplifican la región correspondiente al gen de resistencia a geneticina. Puesto que se han descrito casos en que los vectores de reemplazamiento se integran en el genoma mediante un único evento de recombinación (Bernelot-Moens *et al.,* 2016), se chequeó la presencia del brazo de homología 3' mediante una PCR que amplifica el sitio loxP de esta región (cebadores Ex7-Fw e In7-Rv).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

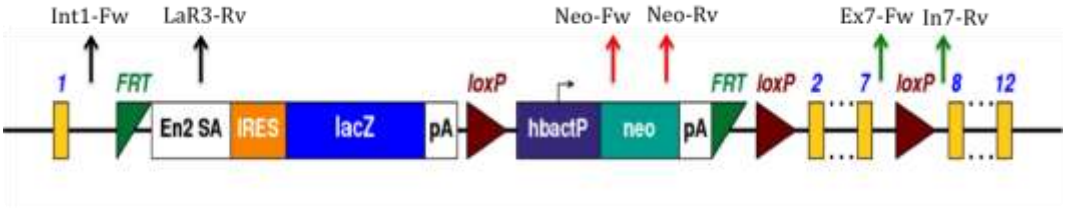


Figura 6. Región de reconocimiento de los cebadores utilizados para el genotipado de las ES murinas transgénicas. En la figura se indican las tres parejas de cebadores utilizadas para el genotipado de las ES murinas mutantes.

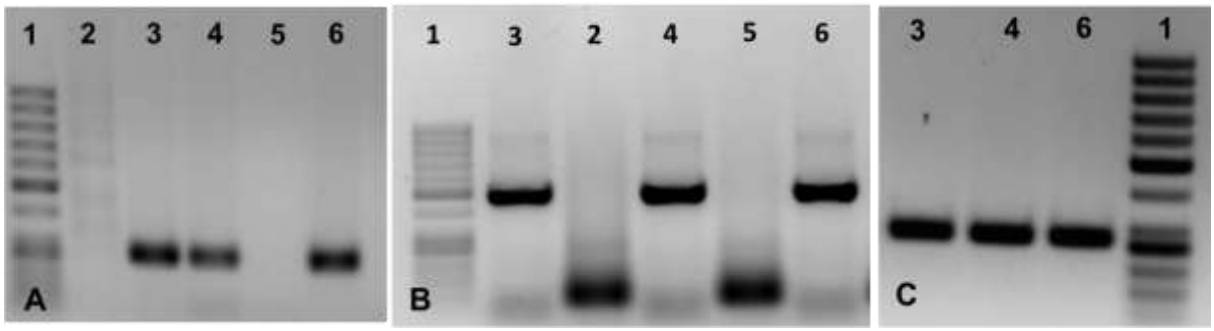


Figura 7. Genotipado mediante PCR de las células ES murinas resistentes a G418 con los cebadores (A) Int1Fw-LaR3Rv, (B) NeoFw-NeoRv y (C) Ex7Fw-In7Rv. Las células ES resistentes a G418 se genotiparon con cebadores específicos de la *cassette* transgénica. (A) Los clones 3, 4 y 6 amplificaron el fragmento esperado de 270 pb, correspondiente al brazo de homología 5'. (B) Se realizó una PCR de las células ES murinas para detectar la región del gen *neo*^{r}. Los clones 3, 4 y 6, anteriormente seleccionados, amplificaron el fragmento esperado de 492 pb. (C) El análisis de la región 3' de la *cassette* transgénica permitió confirmar la presencia del fragmento correspondiente al loxP (318 pb) en los clones 3, 4 y 6. Las bandas se purificaron del gel y el DNA de todos los fragmentos amplificados se secuenció (véase Anexo II). (1) Marcador de masa molecular *GeneRuler 50 bp DNA Ladder*

4.1 Genotipado por *Long-Range* PCR (LRPCR o *long*-PCR) de células ES murinas transgénicas

El genotipado mediante PCR convencional mostrado en el apartado anterior sólo permite confirmar la ausencia o presencia de la *cassette* transgénica, pero no su localización en el genoma, por lo que se llevó a cabo un genotipado adicional, tanto por LRPCR como por transferencia Southern. Estas técnicas nos permitirán asegurar que la integración de la *cassette* transgénica ocurrió por recombinación homóloga en la región adecuada del cromosoma 10 del genoma murino. Para ello, la estrategia seguida en la LRPCR implica que un cebador sea específico de la *cassette* y otro del DNA genómico, correspondiente a nuestro gen (Fig. 8).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

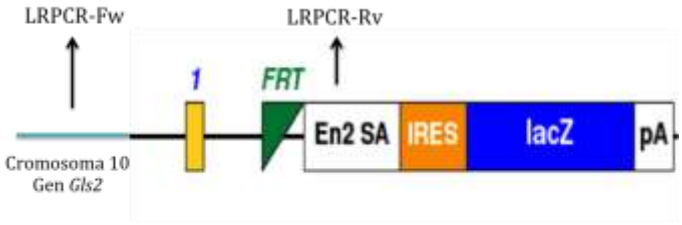


Figura 8. Región de reconocimiento de los cebadores utilizados para el genotipado de las ES murinas transgénicas por LRPCR. El cebador LRPCR-Fw es complementario de la región 5' que queda por delante del intrón 1, y que no se encuentra incluida en el vector de transgénesis. LRPCR-Rv es complementario de la región En2SA de la *cassette* transgénica. El fragmento amplificado, de 5.6 kb, indicará que las células ES murinas han incorporado la *cassette* transgénica por recombinación homóloga, en la región adecuada del cromosoma 10 correspondiente al gen *Gls2*.

Los resultados obtenidos mediante el genotipado por LRPCR (Fig. 9) nos permiten confirmar la integración de la *cassette* transgénica en la región cromosómica correspondiente al gen *Gls2.* Se obtuvieron dos bandas (Fig.9.A), una del tamaño esperado, 5.6 kb, y otra, inespecífica, de menor tamaño (aproximadamente 2.5 kb). Aunque en el control negativo utilizado, DNA de células ES murinas WT, no se observó la banda de 5.6 kb, se aseguró que ésta contuviera la *cassette* transgénica, mediante *Nested* PCR con los cebadores Int1-Fw y LaR3-Rv (Fig.6). El resultado de esta PCR (Fig.9.B) confirma la presencia de la *cassette* transgénica, al amplificar el fragmento correspondiente de 270 pb.

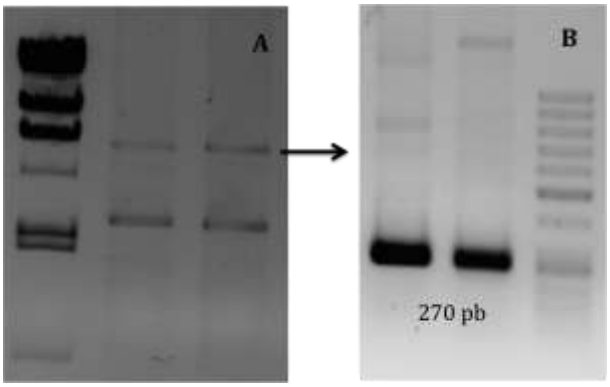


Figura 9. Genotipado mediante LRPCR de las células ES murinas resistentes a G418 con los cebadores LRPCR-Fw y LRPCR-Rv. (A) El tamaño esperado es de aproximadamente 5.6 kb para las células ES murinas que hayan incorporado la *cassette* transgénica mediante recombinación homóloga. En la figura se indica la banda que se purificó del gel para realizar la *nested* PCR. El marcador de masa molecular es λDNA-*Hind*III. (B) *Nested* PCR del fragmento de 5.6 kb con los cebadores Int1-Fw y LaR3-Rv. La amplificación del fragmento de 270 pb confirma la

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

presencia de la *cassette* transgénica en las células ES murinas. El marcador de masa molecular es *Gene Ruler 50 bp.*

4.2 Genotipado de las células ES murinas transgénicas mediante transferencia Southern

Se realizó una transferencia Southern de todas las células ES murinas aisladas como positivas tras la selección por antibiótico y genotipado por PCR convencional. Mediante digestión del DNA genómico aislado de las células ES con la enzima de restricción *BstE*II, y posterior hibridación con la sonda específica, cabe esperar dos fragmentos de aproximadamente 16 kb y 9 kb. El primero correspondiente al alelo que ha incorporado la *cassette* transgénica en el loci adecuado, y el de 9 kb correspondiente al alelo WT (véase Anexo II para un mayor detalle de la estrategia seguida). Por tanto, las células ES que hayan incorporado la *cassette* transgénica presentarán dos bandas, una de 16 kb y otra de 9 kb, mientras que las células ES WT sólo presentarán la banda correspondiente a dicho alelo (9 kb).

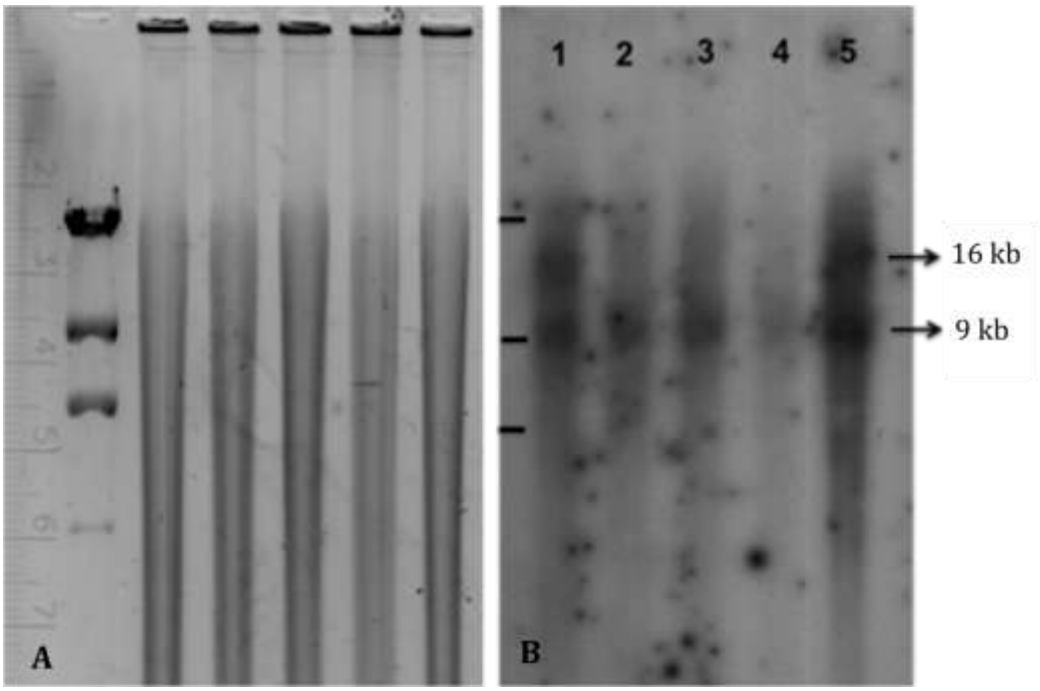


Figura 10. Genotipado de las células ES murinas transgénicas mediante transferencia Southern. (A) Fotografía del gel de agarosa donde se realizó la separación del DNA genómico digerido con *BstE*II. Se puede observar el *smearing* característico que denota que la digestión enzimática del DNA tuvo lugar a un nivel aceptable. El marcador utilizado es λDNA/*Hind*III. (B) Autorradiografía de la membrana Southern hibridada con la sonda específica. A la izquierda de la

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

figura, con un guión negro, se indican las masas moleculares del marcador λDNA/*Hind*III correspondientes a 23, 9.4 y 6.5 kb. Las calles 1 y 5 corresponden a dos células ES que han incorporado la *cassette* transgénica, ya que presentan la banda correspondiente al alelo WT (9 kb) y al alelo mutado (16 kb), mientras que 2, 3 y 4 corresponden a células ES WT.

5. Microinyección de células ES murinas transgénicas en embriones en estadio de 8 células

Las hembras Swiss superovuladas fueron sacrificadas a 2.5 *dpc* para la obtención de los embriones. Para ello, se aislaron los oviductos y parte del cuerno uterino y a través del infundíbulo se inyectó la solución amortiguadora M2 para liberar al medio los embriones (Fig. 11). Posteriormente, se lavaron mediante diferentes pases por el medio M2 y se procedió a la microinyección de las células ES murinas transgénicas.

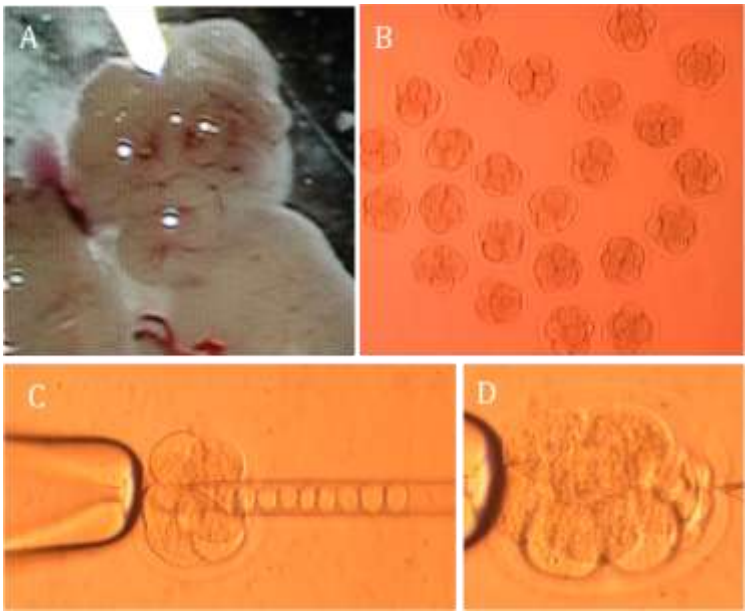


Figura 11. Obtención de embriones y microinyección de células ES murinas transgénicas. (A) Tras el sacrificio se realizó una incisión en la zona de la línea alba. Una vez localizados los ovarios, se eliminó la mayor parte de la grasa y tejido conectivo con ayuda de unas pinzas y se cortó el oviducto y parte del cuerno uterino. (B) El lavado se realizó a través del infundíbulo para liberar los embriones en estadio de 8 células, localizados cerca de la unión útero-tubal. (C y D) Se inyectaron en torno a 10 células ES mutantes por cada uno de los embriones.

La microinyección de células ES puede realizarse en embriones en estadio de ocho células o en blastocistos. Cuando la ICM ya está formada, las células ES transgénicas inyectadas deben competir con las células de la masa interna para

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

formar el embrión, mientras que al inyectarse en embriones en estadio de 8 blastómeras las células ES pueden tener una ventaja competitiva respecto el resto de células indiferenciadas (Huang *et al.,* 2008).

Otras premisas, aparte del estadio del desarrollo embrionario, pueden mejorar la eficiencia del proceso, como por ejemplo la activación de las células ES. Sincronizar las células en su fase exponencial de crecimiento, previo a inyectarlas en el embrión, incrementa el porcentaje de ratones con más del 75% de quimerismo, lo que a su vez favorece a contribuir a la línea germinal. Se puede concluir que la producción de ratones transgénicos a partir de células ES híbridas es más eficiente cuando se activan las células ES y se microinyectan en embriones de 8 blastómeras (Ramírez *et al.,* 2009).

Los embriones se mantuvieron 24 horas en medio KSOM suplementado con 4% de medio ES y se transfirieron al útero de hembras pseudogestantes. Se ha descrito que estos dos procesos proporcionan una ventaja a las células ES frente a los blastómeros existentes en la contribución de la ICM (Ramírez *et al.,* 2009).

Se adjunta una tabla (Tabla 1) con uno de los experimentos llevados a cabo, donde se muestra el número de células ES inyectadas por embrión y los embriones transferidos por ratona. Del número de nacimientos se determina cuántos de ellos son quiméricos y el grado de quimerismo que presentan, tal y como se indica en el apartado de Métodos.

Tabla 1. Tabla que ejemplifica algunos de los experimentos de microinyección.

Embriones inyectados	Nº ES	Nacimientos	Quiméricos	Nivel
16	8	5	0	-
25	8	1	0	-
38	9	1	0	-
40	9	6	3	4
25	11	0	1	3

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Figura 12. Crías quiméricas. El pelaje negro indica una mayor contribución de las células ES transgénicas en el desarrollo del embrión. Mediante cruces y genotipado posterior se comprobará si las células ES mutantes contribuyeron a la línea germinal.

6. Genotipado de ratones transgénicos

Una vez se obtuvieron los fundadores (F1) de la colonia, heterocigotos para el transgén (HT; *Gls2*$^{tm1a/+}$), se realizaron los cruces consecutivos para obtener las crías homocigotas que hubieran incorporado la *cassette* transgénica en ambos alelos (*Gls2*$^{tm1a/tm1a}$). La estrategia de genotipado se basó en tres cebadores, dos específicos del DNA genómico del gen *Gls2* murino y uno de la construcción transgénica. Los animales WT (*Gls2*$^{+/+}$) amplificarán el fragmento comprendido entre los cebadores Int1Fw e Int1Rv, con un tamaño teórico de 432 pb. Los ratones *Gls2*$^{tm1a/tm1a}$ presentarán un amplicón de 270 pb, correspondiente a la amplificación de los cebadores Int1Fw y LaR3Rv; mientras que los animales *Gls2*$^{tm1a/+}$ presentarán ambos fragmentos.

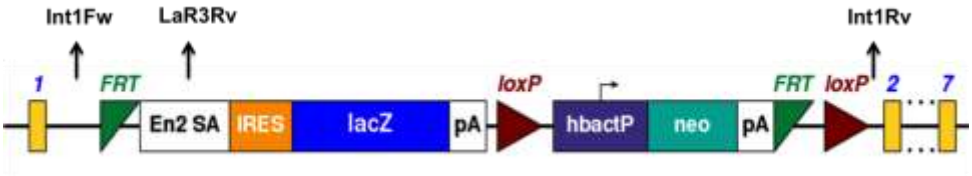


Figura 13. Región de reconocimiento de los cebadores utilizados para el genotipado de los ratones transgénicos. El cebador Int1-Fw se une a la región del intrón 1, mientras que el cebador LaR3-Rv lo hace en la secuencia En2SA del vector, e Int1-Rv a la región del intrón 1 que queda por detrás (3'-cadena abajo) de la *cassette* transgénica. Cabe destacar que la pareja de cebadores Int1Fw-In1Rv reconoce un fragmento de mayor tamaño en los animales que han incorporado la *cassette*; sin embargo, debido a las condiciones del programa de PCR (1 min de extensión) este fragmento no se amplificó.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

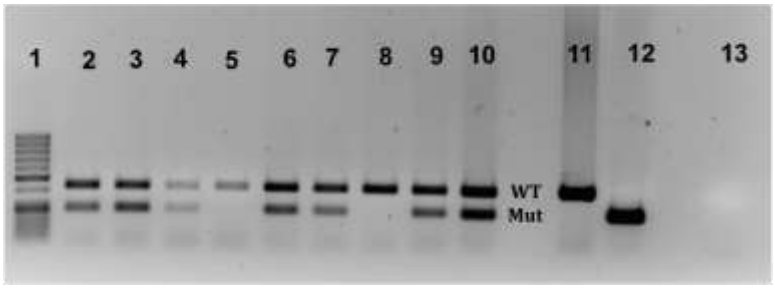


Figura 14. Genotipado mediante PCR de los ratones transgénicos con los cebadores Int1-Fw, Int1-Rv y LaR3-Rv. Se puede observar la presencia de ratones *Gls2*$^{tm1a/+}$ (2, 3, 4, 6, 7, 9, 10) y *Gls2*$^{+/+}$ (5 y 8) en la camada. Los controles utilizados fueron: DNA genómico de animal WT (11), el vector de transgénesis (12) y agua como control de contaminación (13). Se indica la banda WT y la correspondiente a la amplificación de la *cassette* transgénica (Mut). (1) Marcador de masa molecular *GeneRuler 50 bp DNA Ladder*.

7. Análisis de viabilidad de ratones homocigotos *Gls2*$^{tm1a/tm1a}$

Se realizaron múltiples cruces entre animales *Gls2*$^{tm1a/+}$ sin llegar a obtenerse la modificación en homocigosis, pese a que la proporción de animales WT y HT se ajustaba a una distribución mendeliana. Puesto que el vector de transgénesis sigue una estrategia denominada "*KO first allele*", al integrarse en el genoma se generará un alelo nulo como consecuencia de la presencia de una secuencia aceptora de ayuste (En2Sa), que bloquea el proceso de transcripción, y de una señal de poliadenilación (pA) del virus SV40, que trunca el transcrito. Aunque se han descrito casos en los que animales homocigóticos tm1a/tm1a son viables y pueden, de hecho, utilizarse como modelos KO de estudio (Li *et al.*, 2014), la persistente ausencia de crías *Gls2*$^{tm1a/tm1a}$ tras múltiples cruces entre HT nos obligó a concluir que, en nuestro caso, la modificación en homocigosis resulta letal, si bien no podemos determinar si el problema se encuentra en el papel de esta isoforma durante el desarrollo embrionario.

Para analizar si los homocigotos morían durante el periodo de gestación, se sacrificaron 3 ratones a día 10, 12 y 15 de gestación y se examinó si había reabsorciones fetales (fetos evanescentes). La Fig. 15 demuestra que no se observó pérdida fetal y el genotipado de los fetos restantes determinó que todos eran WT o HT.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Figura 15. Imagen de los fetos a diferentes días de gestación. No se observan reabsorciones fetales en ninguna de las hembras sacrificadas.

Los niveles de mRNA y actividad del transcrito KGA (codificado por el gen *Gls*) varían durante el desarrollo embrionario, concretamente disminuyen en el estadio de 2 células y empiezan a incrementar en 4-8 células, hasta alcanzar un máximo en mórula y blastocisto (Chatot *et al.,* 1997). Aunque no se han realizado estudios similares con los transcritos e isoformas GLS2, la ausencia de descendencia con el genotipo *Gls2*$^{tm1a/tm1a}$ apoya la hipótesis que plantea que estas isoformas ejerzan algún papel vital en el desarrollo embrionario. Dado que la ausencia de GLS2 podría resultar letal en los primeros días del desarrollo embrionario, decidimos realizar un genotipado en una etapa previa a la implantación del feto, para detectar la posible presencia del genotipo *Gls2*$^{tm1a/tm1a}$. Con este objetivo, se superovularon hembras HT *Gls2*$^{tm1a/+}$, que fueron posteriormente cruzadas con machos HT *Gls2*$^{tm1a/+}$ para obtener blastocistos (3.5 *dpc*) (Fig. 16). Se recuperaron 48 embriones y aunque la PCR no amplificó todas las muestras, tampoco se observaron homocigotos con genotipo *Gls2*$^{tm1a/tm1a}$ (resultados no mostrados).

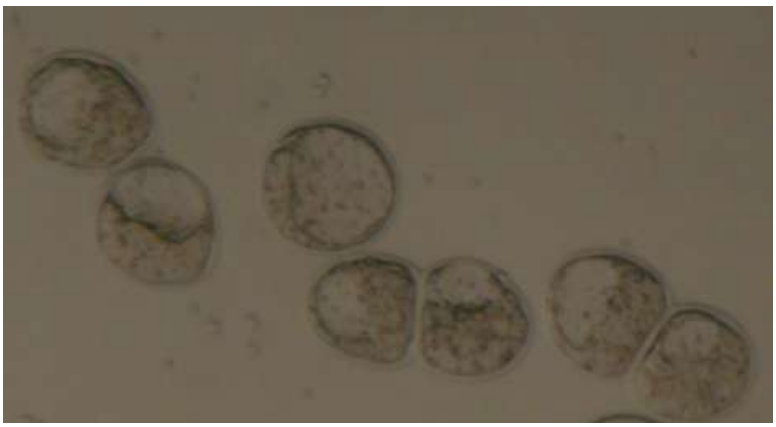


Figura 16. Blastocistos recuperados de hembras heterocigotas *Gls2*$^{tm1a/+}$ superovuladas y cruzadas con machos *Gls2*$^{tm1a/+}$.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Los resultados anteriores sugieren que no se puede descartar un papel esencial del gen *Gls2* en un estadio más temprano del desarrollo embrionario, y también nos obligó a eliminar la trampa génica (secuencias En2Sa y pA) para la obtención de la modificación en homocigosis (Fig. 17). Dicha región a eliminar se localiza entre dos secuencias de reconocimiento FRT, por lo que se recurre a cruces con animales que expresen la recombinasa FLP para eliminarla (como explicamos en secciones anteriores de esta memoria, la recombinasa FLP escinde los fragmentos de DNA flanqueados por secuencias FRT). Junto a las secuencias mencionadas, también se eliminará el gen *neo*^{r}, cuya presencia parece tener un efecto directo en la expresión de otros genes del mismo locus en el que se inserta el transgén (Fiering *et al.,* 1995), lo que es importante para el posterior análisis genotípico y fenotípico del modelo murino, eliminando así posibles efectos secundarios no específicos o no atribuibles directamente al silenciamiento génico del gen *Gls2* murino.

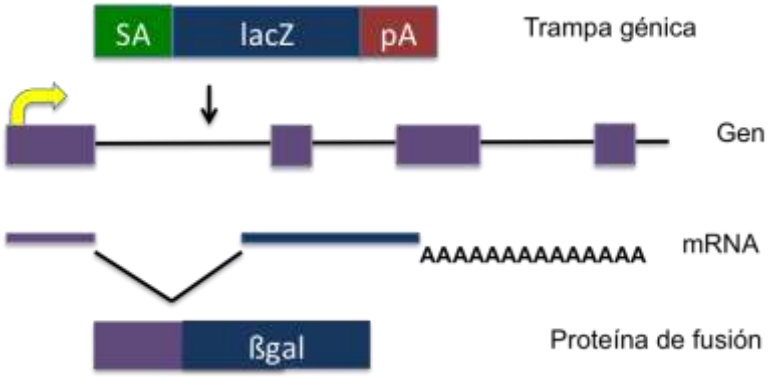


Figura 17. Representación del modo de actuación de la trampa génica. Una vez se inserte en el gen correspondiente, la transcripción quedará interrumpida por la presencia de la secuencia aceptora de ayuste (SA) y la secuencia de poliadenilación (pA), generándose una proteína quimérica, que tendrá parte del gen de interés fusionado a la β-galactosidasa (*lacZ*).

8. Cruces de la colonia *Gls2*$^{tm1a/+}$ generada con animales que expresan la Flp recombinasa

De las dos colonias de animales que expresan Flp y que están disponibles actualmente en nuestro grupo de investigación, se utilizaron ratones FlpO por su mayor eficacia en la escisión de la *cassette* transgénica (el gen *Flp* está regulado

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

bajo un promotor constitutivo CAG) (Fig. 18). Una vez se estableció la colonia de dichos animales, se cruzaron con los ratones HT *Gls2*$^{tm1a/+}$ para la obtención de los animales HT *Gls2*$^{tm1c/+}$ (el alelo tm1c se diferencia del tm1a en que no posee la región comprendida entre los sitios FRT; es igual al alelo WT con la excepción de los sitios loxP que flanquean los exones de interés).

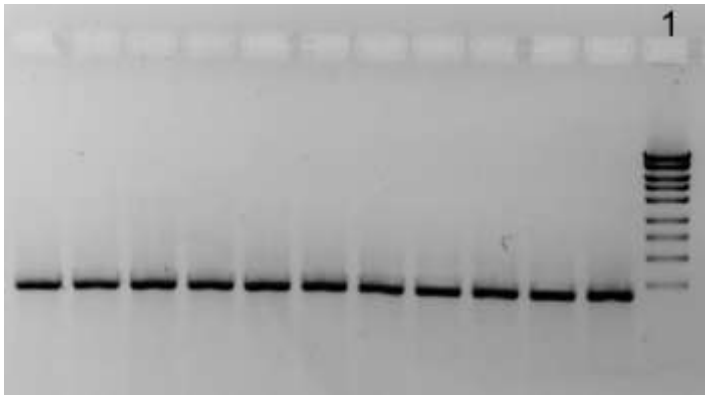


Figura 18. Genotipado mediante PCR de la colonia de ratones FlpO con los cebadores FlpO-Fw y FlpO-Rv. Se puede observar la presencia del transgén FlpO con un tamaño de 1239 pb. (1) Marcador de masa molecular *Mass Ruler High Range DNA Ladder*.

El genotipado de los animales resultantes del cruce de HT *Gls2*$^{tm1a/+}$ con ratones que expresan la recombinasa FlpO, se realizó con los cebadores Int1-Fw, Int1-Rv y LaR3-Rv (Fig. 19; estrategia indicada en la Fig. 13). Los dos primeros cebadores generarán un fragmento de 432 pb en los animales WT y de 567 pb en los animales *Gls2*$^{tm1c/+}$, de mayor tamaño como consecuencia de las regiones loxP y la única FRT restante (Fig. 2 de Materiales). Sin embargo, la PCR se realiza con los tres cebadores conjuntamente, puesto que aún puede haber animales HT con el genotipo *Gls2*$^{tm1a/+}$ y, por tanto, con la *cassette* transgénica aún sin eliminar (fragmento de 270 pb).

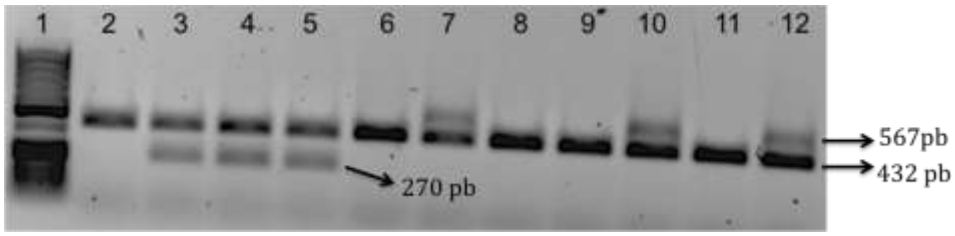


Figura 19. Genotipado mediante PCR del cruce de animales HT *Gls2*$^{tm1a/+}$ y animales FlpO con los cebadores Int1-Fw, Int1-Rv y LaR3-Rv. Los animales *Gls2*$^{tm1c/+}$ (7, 10, 12) amplifican un fragmento de 567 pb, correspondiente al alelo tm1c y otro de 432 pb correspondiente al WT. Los animales *Gls2*$^{tm1a/+}$ (3, 4, 5) amplificaron el fragmento correspondiente al alelo WT y al tm1a (270

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

pb). Por último, los animales WT (2, 6, 8, 9 y 11) sólo amplificaron 432 pb (alelo silvestre). Marcador de masa molecular *GeneRuler 50 bp DNA Ladder*. El fragmento correspondiente al alelo tm1c se purificó del gel y se secuenció (véase Anexo II).

Se debe comprobar que los animales *Gls2*$^{tm1c/+}$ hayan incorporado la modificación en la línea germinal; además, es necesario eliminar la expresión de la recombinasa FlpO para evitar que interfiera en futuros cruces. Con estos objetivos en mente, los animales obtenidos se cruzaron con ratones WT y se obtuvieron un 50% de animales WT y 50% *Gls2*$^{tm1c/+}$, por lo que se confirma la presencia en la línea germinal del alelo tm1c (Fig. 20). De aquellos animales que poseían el genotipo *Gls2*$^{tm1c/+}$ se seleccionaron los que no expresaban la recombinasa Flp.

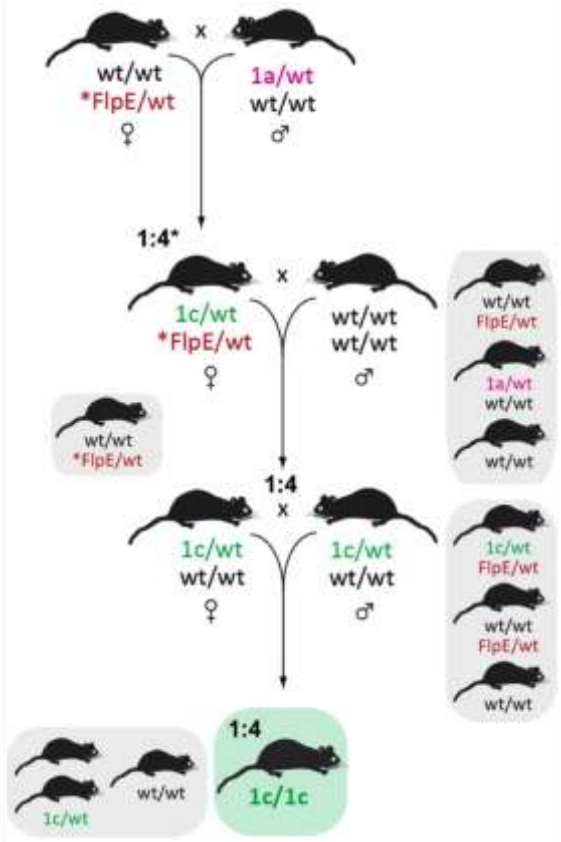


Figura 20. Esquema de los cruces a realizar entre los animales HT *Gls2*$^{tm1a/+}$ y Flp para la obtención del genotipo *Gls2*$^{tm1c/+}$. Se muestran los cruces necesarios para la obtención de la colonia de animales homocigotos *Gls2*$^{tm1c/tm1c}$. En este caso, los animales HT *Gls2*$^{tm1a/+}$ se cruzan con ratones que expresan la recombinasa FlpE (Adaptado de Coleman *et al.* 2015).

Actualmente estamos cruzando los animales HT *Gls2*$^{tm1c/+}$ (Fig. 21) entre sí para obtener la modificación en homocigosis. Cabe señalar que la cepa de ratones FlpO utilizada es C57BL/6, mientras que los ratones *Gls2*$^{tm1a/+}$ provenían de células

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

ES murinas B6D2, por lo que realizaremos retrocruces para obtener un fondo genético homogéneo, y posteriormente cruzarlos con ratones que expresen la recombinasa Cre (C57BL/6).

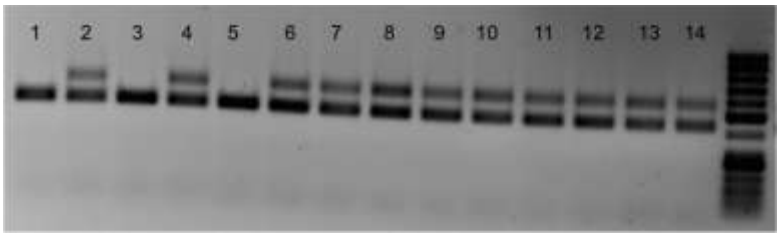


Figura 21. Genotipado mediante PCR de ratones HT *Gls2*$^{tm1c/+}$. Se puede observar el fragmento correspondiente al alelo WT (432 pb) y tm1c (567 pb). Marcador de masa molecular *GeneRuler 50 bp DNA Ladder*.

9. Análisis fenotípico molecular de los animales heterocigotos *Gls2*$^{tm1a/+}$

Dado que el alelo tm1a bloquea la transcripción del gen diana, se evaluó la expresión génica de *Gls2* mediante qRT-PCR, inmunotransferencias Western y medida de actividad GA para ver si existían diferencias en los niveles de mensajero, proteína y actividad enzimática, respectivamente, entre los animales WT, los HT *Gls2*$^{tm1a/+}$ y los HT *Gls2*$^{tm1c/+}$. Estos últimos deberían tener un comportamiento similar a los WT ya que se ha revertido el genotipo, a excepción de dos secuencias loxP en regiones intrónicas, cuya presencia no debería interferir en la expresión de la proteína. En cambio, el genotipo HT *Gls2*$^{tm1a/+}$ se podría considerar como un modelo intermedio con relación al KO nulo de *Gls2* en todo el organismo y, por lo tanto, consideramos interesante evaluar si existían diferencias significativas de expresión de *Gls2* en ambos modelos o, si por el contrario, el alelo WT restante de *Gls2* y/o el otro gen de GA (*Gls*) podían compensar la función de *Gls2*.

9.1 Análisis de expresión de isoenzimas GA en animales WT, *Gls2*$^{tm1a/+}$ y *Gls2*$^{tm1c/+}$ mediante qRT-PCR

Previo a la realización de la qRT-PCR y aunque la eficiencia de los cebadores ya había sido comprobada (Martín-Rufián *et al.,* 2012), se llevaron a cabo curvas de diluciones seriadas para las tres parejas de cebadores específicos utilizadas y se verificó la ausencia de dímeros de cebadores mediante curvas de fusión y análisis

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

en gel de agarosa. Las eficiencias de amplificación estuvieron comprendidas entre el 95 y 100%.

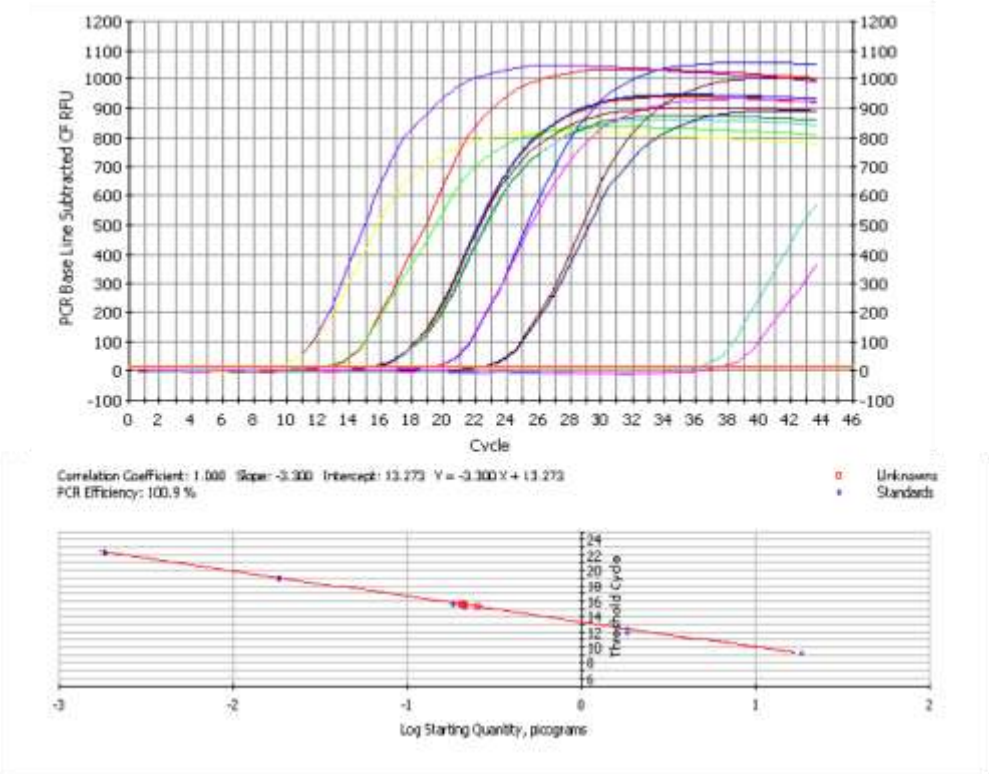
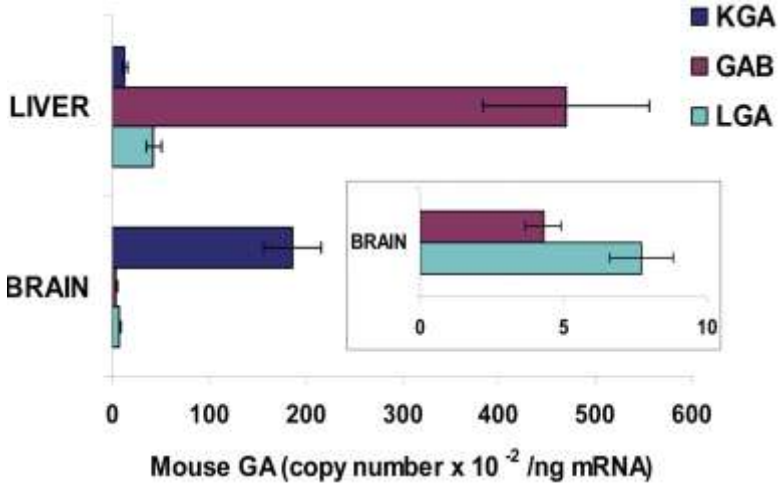


Figura 22. Curvas de dilución y pendiente obtenidas para los cebadores de β-actina. La eficiencia para esta pareja de cebadores fue del 100.9%.

Una vez se comprobó la integridad del RNA total aislado de las tres colonias animales, se llevó a cabo la qRT-PCR para la cuantificación de los dos transcritos GLS2 de GA en cerebro e hígado, dos tejidos donde previamente se había demostrado la expresión de ambas isoformas GLS2 (GAB y LGA, véase la Fig. 23).



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Figura 23. Diferencias en el número de copias de mRNA de KGA, GAB y LGA en hígado y cerebro de ratón. La isoenzima KGA es la más abundante en cerebro, siendo 15 veces superior a la suma de los transcritos GLS2. En hígado, la isoforma GLS2 mayoritaria es GAB (11 veces superior a LGA), mientras que los niveles de KGA son prácticamente nulos (Martín-Rufián *et al.,* 2012).

Se llevó a cabo una cuantificación relativa de mRNA comparando la expresión de GAB y LGA en *Gls2*$^{tm1a/+}$ y *Gls2*$^{tm1c/+}$ respecto los animales WT (n=6 por genotipo), expresándose la variación como un incremento o disminución en la expresión. Como gen constitutivo normalizador se utilizó la ß-actina, dado que en los tres genotipos analizados el ciclo umbral (Ct) al que empezó a detectarse fue similar (en torno al ciclo 20-23, dependiendo de la réplica), se consideró un buen gen constitutivo para nuestro estudio. Esta misma metodología y gen constitutivo fue la empleada en la cuantificación de los transcritos GLS en ratones KO (*Gls*$^{-/-}$) para dicho gen (Masson *et al.,* 2006).

Mientras que no se detectaron cambios significativos entre los animales WT y los *Gls2*$^{tm1c/+}$, los ratones *Gls2*$^{tm1a/+}$ mostraron una disminución significativa en cerebro de los niveles de mRNA de GAB (**p=0.0038, Kruskal-Wallis) y LGA (**p=0.0011, Kruskal-Wallis) y del transcrito GAB en hígado (**p=0.0026, Kruskal-Wallis)(Fig. 24). Se puede concluir que la incorporación de la *cassette* transgénica en heterocigosis, con la consecuente interrupción de la transcripción, conlleva a una disminución de aproximadamente el 50% de las isoformas GLS2 en el genotipo *Gls2*$^{tm1a/+}$ *vs* las colonias *Gls2*$^{tm1c/+}$ y WT .

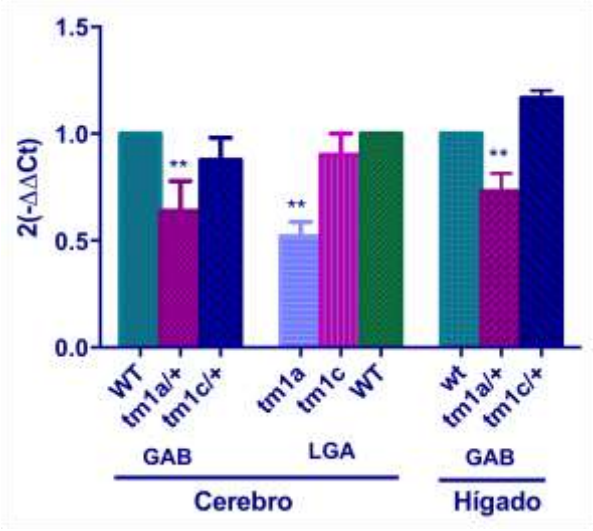


Figura 24. Niveles de mRNA de GAB y LGA en cerebro e hígado de animales *Gls2*$^{tm1a/+}$ *vs* WT y *Gls2*$^{tm1c/+}$. Hay una disminución significativa en los niveles de transcritos GLS2 en cerebro

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

en los animales *Gls2*$^{tm1a/+}$ en comparación con los animales WT y *Gls2*$^{tm1c/+}$, mientras que en hígado sólo se redujo apreciablemente la isoforma GAB (n=6/genotipo; **p<0.005).

9.2 Análisis de expresión de isoenzimas GA en animales WT, *Gls2*$^{tm1a/+}$ y *Gls2*$^{tm1c/+}$ mediante inmunotransferencias Western

Se realizó un análisis de expresión de la proteína GAB por inmunotransferencia Western para evaluar las posibles diferencias a nivel de proteína en los tres genotipos. Para ello se utilizaron anticuerpos isoenzima-específicos anti-GAB, desarrollados en nuestro laboratorio (Fig. 25). Como control positivo se utilizó proteína GAB humana recombinante purificada (Campos-Sandoval *et al*., 2003).

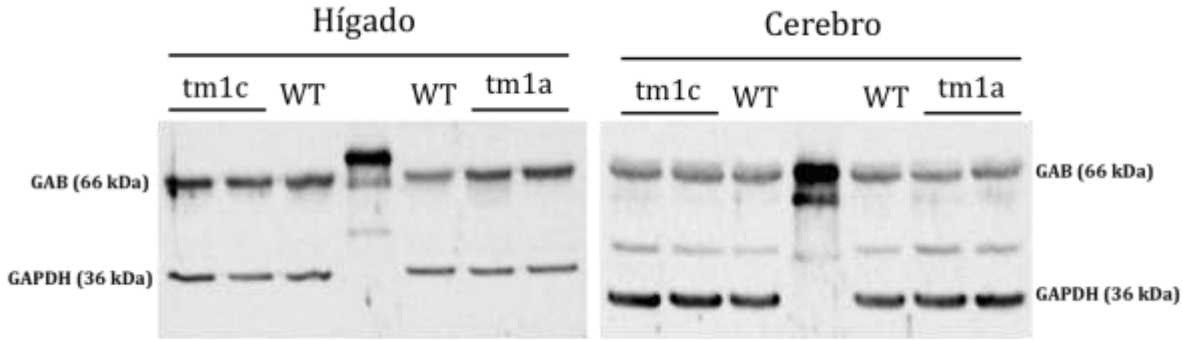


Figura 25. Inmunotransferencia Western de GAB en hígado (panel izquierdo) y cerebro (panel derecho) de animales WT (n=6), *Gls2*$^{tm1a/+}$ (tm1a, n=6) y *Gls2*$^{tm1c/+}$ (tm1c, n=6). Se realizó un análisis cuantitativo de GAB (66 kDa) mediante densitometría, utilizando como control de carga GAPDH (36 kDa). No se vieron diferencias significativas entre los genotipos analizados. En ambos paneles, la calle no rotulada corresponde al control positivo de proteína GAB humana recombinante.

No se observaron diferencias significativas entre los grupos analizados en ninguno de los dos tejidos (ANOVA p=0.99) (Fig. 26). Por tanto, la conclusión del análisis conjunto de expresión de mRNA y proteína GAB, codificada por el gen *Gls2*, es que no existe una correlación entre los niveles de transcrito (que se reducen significativamente) y proteína (que se mantienen esencialmente invariables) en el genotipo *Gls2*$^{tm1a/+}$. Diferentes mecanismos postranscripcionales y/o postraduccionales pueden explicar esta falta de correlación que, por otra parte, ha sido frecuentemente detectada en un gran número de análisis masivos de expresión de genes de mamíferos (véase, como ejemplo, Pradet-Balade *et al*., 2001). Además, conviene resaltar que en estudios de expresión de GA en cerebro

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

de ratones sometidos a protocolos de adicción a cocaína ya se observó una marcada disociación entre niveles de mRNA y proteína (Blanco *et al*[1]., 2012). Por último, en el segundo bloque de resultados de esta memoria, en la caracterización de un modelo transgénico KO para el receptor del ácido lisofosfatídico LPA_1, volveremos a encontrarnos con esta disociación para la isoforma KGA, codificada por el gen *Gls.*

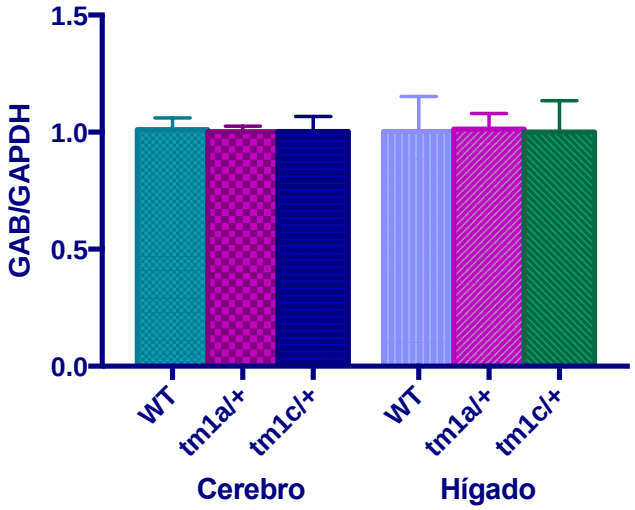


Figura 26. Diferencias en el nivel de proteína GAB (normalizada frente a GAPDH) entre animales WT, *Gls2*$^{tm1a/+}$ y *Gls2*$^{tm1c/+}$ en cerebro e hígado. En cerebro, los animales WT presentaron un valor GAB/GAPDH medio de 1±0.05, los *Gls2*$^{tm1a/+}$ de 1±0.02 y los animales *Gls2*$^{tm1c/+}$ de 1±0.06. En hígado, la media de WT fue de 1±0.15, en *Gls2*$^{tm1a/+}$ de 1±0.07 y en *Gls2*$^{tm1c/+}$ de 0.9±0.13. Los valores son media ± SEM (n = 6 animales por cada genotipo).

9.3 Análisis de expresión de isoenzimas GA en colonias WT, *Gls2*$^{tm1a/+}$ y *Gls2*$^{tm1c/+}$ mediante cuantificación de la actividad enzimática

Como se ha indicado, las medidas de actividad GA se realizaron en los tres genotipos analizados (Tabla 3 y Fig. 27), además de llevar a cabo dos valoraciones diferentes, una en presencia de Glu (inhibidor competitivo de las isoenzimas GLS) y otra en su ausencia (en la tabla 3 se representan los valores obtenidos en los ensayos sin Glu).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tabla 2. Medidas de actividad GA (expresadas como mU/mg de proteína) en hígado y cerebro de los tres genotipos analizados (*p=0.022; Los valores se muestran como media ± SEM)

	Actividad GA en cerebro (mU/mg)	Actividad GA en hígado (mU/mg)
WT	15.6±2.5	11,2±2.6
***Gls2*$^{tm1a/+}$**	10.8±2.6	9.3±1.1
***Gls2*$^{tm1c/+}$**	14±0.75	18.2±2.2*

En hígado, la actividad GA (medida en ausencia de Glu) mostró diferencias significativas entre los genotipos analizados (*p=0.022, ANOVA). Mediante un análisis *post-hoc* (LSD de Fisher) se distinguen dos grupos que difieren entre sí, WT *vs* *Gls2*$^{tm1c/+}$ y *Gls2*$^{tm1a/+}$ *vs* *Gls2*$^{tm1c/+}$ (Tabla 3, Fig. 27). Al comparar los resultados obtenidos en las medidas de actividad GA en hígado en presencia y ausencia de Glu, no se observan diferencias significativas, lo que confirma el papel de GLS2 como isoenzima principal en este órgano (la ausencia de disminución en la actividad en presencia de Glu atestigua la carencia de isoenzimas GLS).

En cerebro, las diferencias de actividad entre genotipos no fueron significativas (p= 0.68, Kruskal-Wallis) (Tabla 3 y Fig. 27). Sin embargo, en este caso el tratamiento con Glu conlleva una inhibición total de la actividad GA en cerebro, (***p<0.0001, t-test). Estos resultados confirman que la KGA es la isoenzima principal en cerebro de ratón, como se ha detallado previamente (Olalla *et al.*, 2002; Martín-Rufián *et al.,* 2012).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

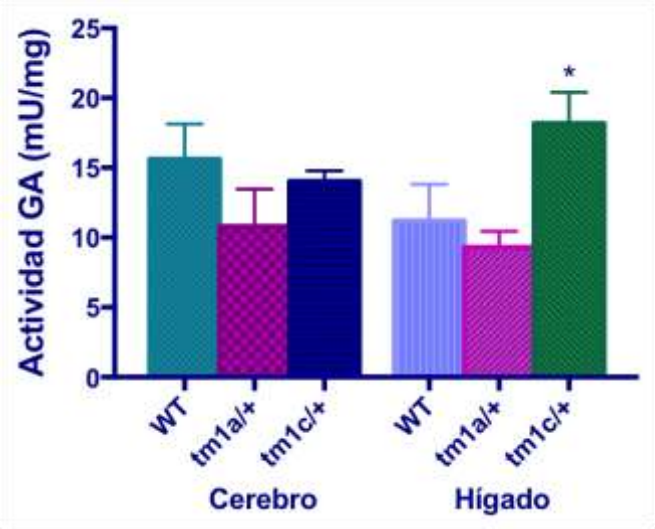


Figura 27. Actividad GA (mU/mg) en cerebro e hígado de animales WT, *Gls2*$^{tm1a/+}$ y *Gls2*$^{tm1c/+}$. Los valores corresponden a ensayos realizados en ausencia de Glu. En hígado se observaron diferencias significativas entre los tres genotipos analizados (*p=0.022). Los valores se representan como media ± SEM (n = 6 animales por genotipo).

En principio, podrían esperarse diferencias entre WT y el genotipo *Gls2*$^{tm1a/+}$ y valores equivalentes de actividad GA entre WT y el genotipo *Gls2*$^{tm1c/+}$; sin embargo, cabe destacar que en los estudios fenotípicos el fondo genético de los animales es de especial importancia. Jackson Laboratory tiene disponible una base de datos con diferencias entre distintas cepas de animales, y aunque aún no hay registrada información referente a la actividad enzimática GA, varios grupos de investigación sí han confirmado este hecho para otras enzimas. Por ejemplo, se ha visto una mayor actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa en hígado de animales C57BL/6 (41 U/g) comparados con DBA/2J (23 U/g) y con cepas híbridas, que obtenían medidas intermedias (Balak *et al.,* 1982). Se han descrito resultados similares en cuanto a la actividad de la enzima málica al comparar animales C57BL/6 y DBA/2J (Coleman & Kuzava, 1991).

Tras el estudio realizado a nivel de mRNA, proteína y actividad enzimática, se determina la necesidad de obtener el homocigoto *Gls2*$^{tm1c/tm1c}$ como modelo murino a caracterizar, tanto por la posible acción compensatoria del alelo WT en la función GA, como por el efecto que conlleva trabajar con diferentes cepas a la hora de realizar estudios comparativos, siendo necesario establecer un fondo genético homogéneo.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

10. Cruce de la colonia *Gls2*$^{tm1c/tm1c}$ con animales que expresan la Cre recombinasa

Actualmente hemos fijado la colonia de ratones que expresan la recombinasa Cre bajo un promotor de sinapsina de rata (específico de cerebro) (Fig. 28). La expresión comienza a día embrionario 11.5 (E11.5) para alcanzar un pico a E12.5, tanto en neuronas de corteza, hipocampo, diencéfalo (hipotálamo, tálamo, subtálamo, epitálamo y III ventrículo), médula espinal, como en algunas células de Purkinje de cerebelo (Ma *et al.,* 1999; Zhu *et al.,* 2001).

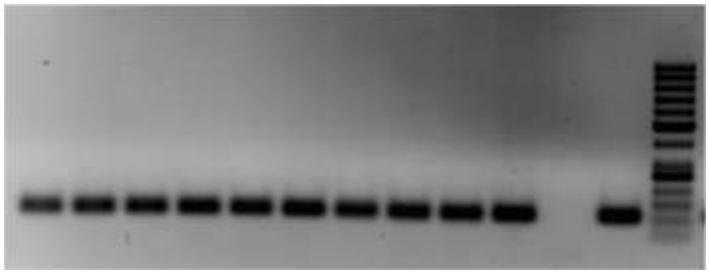


Figura 28. Genotipado mediante PCR de los ratones que expresan la recombinasa Cre con los cebadores Cre-Fw y Cre-Rv. Se puede observar la banda correspondiente al transgén de 100 pb en la mayoría de los animales de la colonia analizada**.** Como marcador de masa molecular se utilizó *GeneRuler 50 bp DNA Ladder.*

Cuando se obtengan los ratones homocigotos *Gls2*$^{tm1c/tm1c}$, los cruzaremos con los animales que expresan la recombinasa Cre bajo el promotor de sinapsina, lo que permitirá obtener un animal KO (*Gls2*$^{-/-}$) para el gen *Gls2* en cerebro, concretamente en las regiones donde se ha visto una mayor expresión de esta isoenzima: corteza, hipocampo, cerebelo (Olalla *et al.,* 2012), permitiendo elucidar la función cerebral de estas isoenzimas GLS2.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

PARTE II: CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ISOENZIMAS GA EN EL MODELO MURINO KOLPA$_1$

1. Inmunohistoquímica de isoformas GA en animales KOLPA$_1$

Con el fin de analizar el efecto que el silenciamiento del receptor LPA$_1$ puede tener en la expresión de las isoenzimas GA en cerebro, se llevó a cabo un análisis de la expresión de KGA y GLS2 (GAB y LGA) mediante inmunohistoquímica. Los anticuerpos anti-KGA empleados son específicos de esta isoforma, ya que están dirigidos contra la región C-terminal, y por tanto, no reconocen la isoforma GAC. Los anticuerpos anti-GAB utilizados reconocen ambas isoformas, GAB y LGA (Olalla *et al*. 2002; Campos *et al*. 2003; Olalla *et al*. 2008; Cardona *et al*. 2015).

El marcaje obtenido con los anticuerpos anti-KGA mostró una localización citoplasmática de aspecto punteado, típica mitocondrial, de acuerdo con resultados previos de localización de KGA en cerebro de mamíferos (Olalla *et al.,* 2002; Cardona *et al.,* 2015). Sin embargo, cabe destacar diferencias en la intensidad del marcaje en varias regiones cerebrales al comparar entre los genotipos analizados. Se observa una clara disminución de la expresión de KGA en corteza e hipocampo de animales HT (Fig. 29, B,E,H,K) y KOLPA$_1$ (Fig.29 C,F,I,L) en comparación con las mismas áreas de cerebros WT (Fig.29 A,D,G,J). Concretamente, las regiones más afectadas fueron: las neuronas piramidales de la región CA3 y el neuropilo del estrato lacunoso-molecular de CA1 de hipocampo, y el giro dentado (Fig.29 J,K,L). En cerebelo, no se observaron cambios en la expresión de KGA. Las diferencias observadas en la intensidad del marcaje fueron graduales desde animales WT a KOLPA$_1$, lo que podría implicar una reducción proporcional en los niveles de la isoforma KGA cuando los niveles del receptor LPA$_1$ disminuyen. Asimismo, se detectó un cambio en el marcaje perivascular en los animales con menor expresión de LPA$_1$, especialmente en KOLPA$_1$ (Fig.29 M,N,Ñ).

La disminución en los niveles de expresión de KGA, la isoenzima GA más abundante en tejido cerebral (Blanco *et al*., 2012; Martín-Rufián *et al.*, 2012), fue completamente inesperada y no puede explicarse en base a resultados previos que

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

han demostrado alteraciones en el cerebro de estos animales KOLPA$_1$. Así, por ejemplo, se ha publicado previamente que los animales KOLPA$_1$ presentan una reducción de neuronas corticales, pero dicho descenso sólo ocurre en las capas I/III, V y VI de la corteza cerebral (Estivill-Torrús *et al.,* 2008), por lo que resulta insuficiente para justificar la reducción detectada de la proteína KGA en corteza y resto de regiones, particularmente hipocampo. De forma análoga, se ha descrito una menor neurogénesis en el giro dentado de los ratones KOLPA$_1$ (Matas-Rico *et al*., 2008), que podría contribuir parcialmente al déficit de KGA en esta subregión cerebral, pero que, sin duda, no explica el silenciamiento de la expresión de KGA en otras regiones hipocampales.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

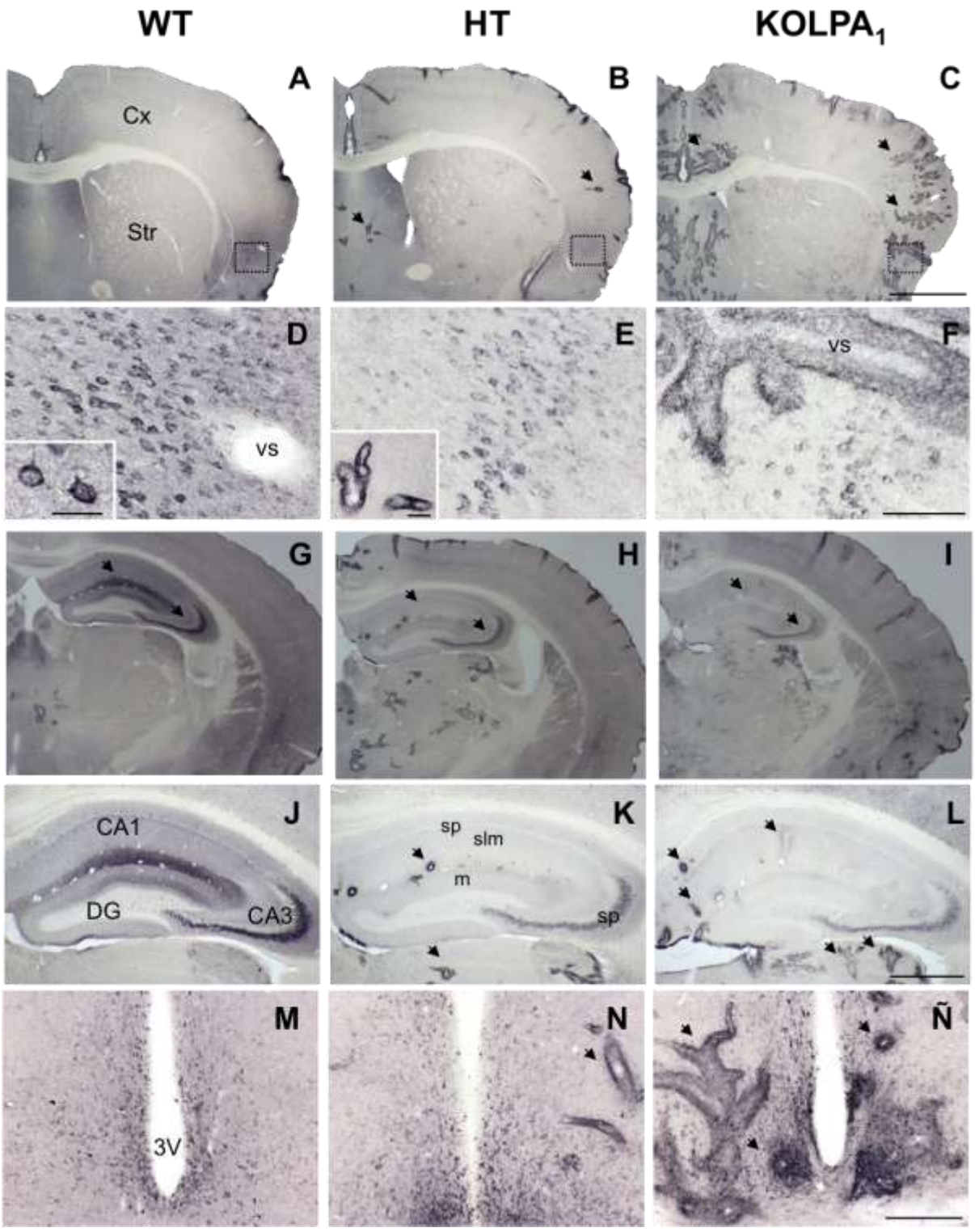


Fig 29. Localización inmunohistoquímica de KGA en animales WT, heterocigotos (HT) y KOLPA$_1$. Se puede observar una reducción progresiva en el marcaje de KGA de animales WT a KOLPA$_1$, con un fenotipo intermedio en los HT. (A-C) Panorámica de la corteza (Cx) y estriado (Str), las flechas indican vasos sanguíneos inmunorreactivos para KGA. (D-F) Detalle del cambio progresivo en el marcaje perivascular de la corteza insular. (G-I) Panorámica del hipocampo, las flechas indican los cambios en el marcaje de CA1 y CA3. (J-L) Disminución en el marcaje del slm y

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

DG en HT y KOLPA$_1$ y en neuronas de CA$_3$. (M-Ñ) En áreas subtalámicas, cerca del III ventrículo se observa un cambio en el marcaje perivascular en animales KOLPA$_1$. En cerebelo no se observaron diferencias (no se muestran resultados de esta región). Cx, corteza; Str, estriado; VS, vaso sanguíneo; CA1, CA3 subcampos hipocampales; sp estrato piramidal; slm, estrato lacunoso-molecular; DG, giro dentado; m, capa molecular; 3V, tercer ventrículo. Barras de escala: A-C, 1 mm; D-F, 100 µm; detalle D, 25 µm; detalle E, 40 µm; J-L, 500 µm; M-Ñ 200 µm.

En contraposición con KGA, los patrones de inmunomarcaje frente a las isoformas GLS2 fueron esencialmente idénticos para los tres genotipos de animales estudiados (Fig. 30). No se detectaron cambios aparentes en la expresión de GLS2 en las diferentes regiones cerebrales analizadas por inmunohistoquímica, tales como corteza, estriado (Fig. 20 A-C), hipocampo (Fig. 30 D-F) o cerebelo (Fig. 30 G-I). La inmunotinción GLS2 reveló un patrón distintivo con relación a KGA, mostrando un marcaje característico mayoritariamente nuclear, de acuerdo con resultados previos de inmunolocalización de GLS2 en cerebro de mamíferos (Olalla *et al*., 2002; Cardona *et al*., 2015).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

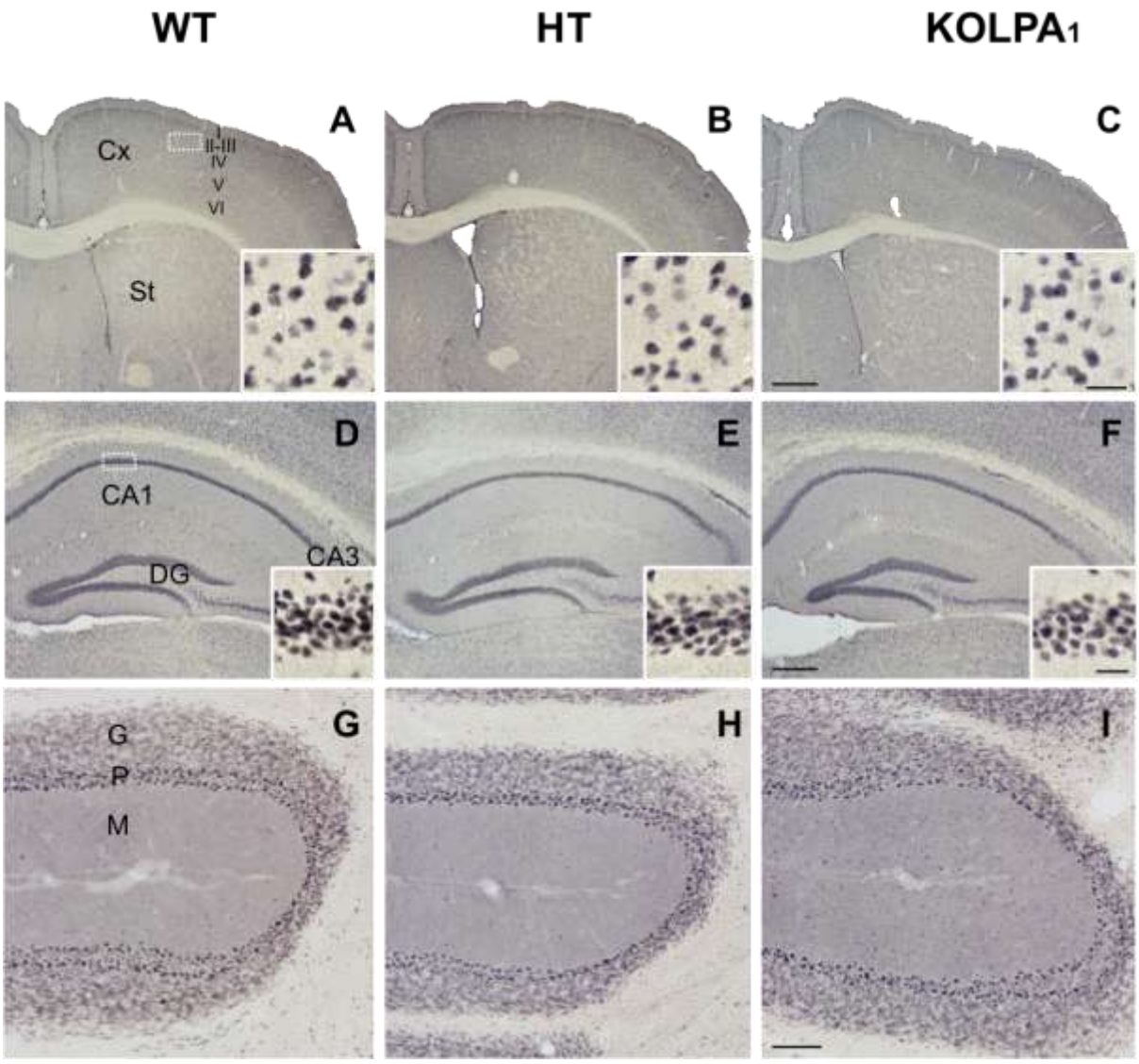


Fig 30. Localización inmunohistoquímica de las isoformas GLS2 en animales WT, heterocigotos (HT) y KOLPA$_1$. GLS2 se concentra fundamentalmente en el núcleo de las regiones cerebrales analizadas. (A-C) Panorámica de la corteza cerebral, con detalles de la capa III de la corteza motora que se muestran en los recuadros. (D-F) Hipocampo y detalle del estrato piramidal de CA1. (G-I) Cerebelo. No se observan diferencias entre los distintos genotipos en las regiones cerebrales estudiadas. Cx, corteza; St, estriado; CA1 y CA3 subcampos hipocampales; DG, giro dentado; G, capa granular del cerebelo; P, capa de Purkinje; M, capa molecular del cerebelo. Barra de escala: A-C: 500 µm; D-F: 250 µm; G-I: 100 µm; Recuadros 20 µm.

2. Evaluación de los niveles de proteína KGA mediante inmunotransferencia Western en animales KOLPA$_1$

Para apoyar los resultados de inmunohistoquímica de las isoformas GA cerebrales, realizamos inmunotransferencias Western de extractos proteicos totales aislados de corteza cerebral e hipocampo (Fig. 31). Los resultados

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

obtenidos demostraron una disminución de la expresión de la proteína KGA en ambas regiones, de acuerdo con la drástica disminución observada por inmunohistoquímica. Por el contrario, los niveles de proteínas GLS2 no mostraron diferencias significativas (resultados no mostrados).

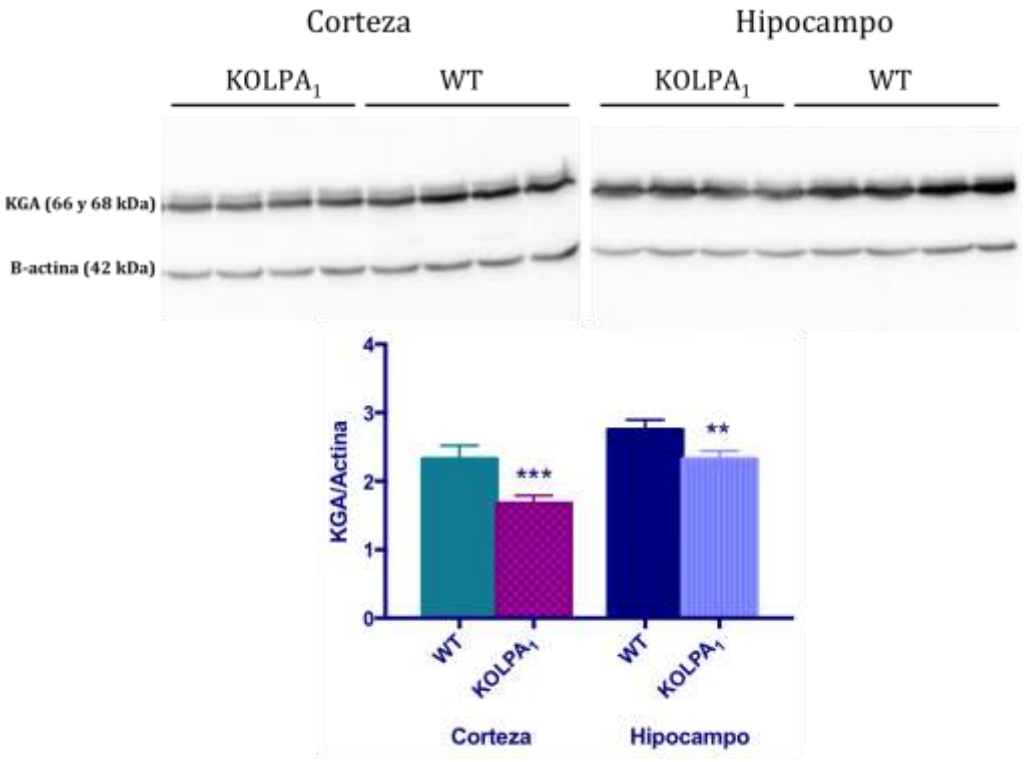


Figura 31. Análisis por inmunotransferencia Western de la expresión de la isoforma KGA en corteza cerebral e hipocampo. Extractos proteicos totales (40 µg), de corteza cerebral e hipocampo, de los genotipos WT y KOLPA$_1$ fueron analizados por inmunotransferencia Western. Se llevó a cabo un análisis cuantitativo por densitometría y los valores de expresión de KGA fueron normalizados frente a β-actina, empleada como control de carga. Los valores se representan como media±SEM (n=9 por genotipo) ***p<0.001; **p<0.01.

3. Cuantificación del transcrito KGA en regiones cerebrales de animales KOLPA$_1$

La cuantificación del transcrito KGA se llevó a cabo mediante RT-PCR cuantitativa en diferentes regiones cerebrales: corteza prefrontal (PFC), corteza parietal motora (PM), estriado (STR), hipocampo (HIP), giro dentado (DG) y cerebelo (CB) en un total de cinco animales/genotipo. En este caso, la cuantificación de KGA fue absoluta, expresando el resultado como el número de copias de mRNA (± SEM) por ng de RNA total.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Los niveles de mRNA de KGA no mostraron variación significativa en la mayoría de las regiones cerebrales analizadas de ambos genotipos, excepto en PFC y PM, donde hubo una disminución significativa en los ratones $KOLPA_1$, con un valor de p de 0.011 y 0.009, respectivamente (t-test) (Fig. 32).

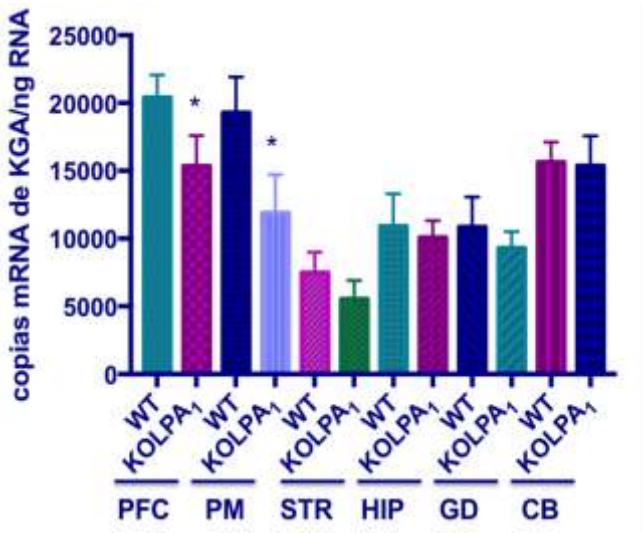


Figura 32. Número de copias de mRNA de KGA en los animales WT y $KOLPA_1$ en las diferentes regiones cerebrales analizadas. Únicamente se observaron diferencias en PFC (WT 20404±1676; $KOLPA_1$ 5348 ± 2240) y PM (WT 19280 ± 2640; $KOLPA_1$ 11876 ± 2840). Los valores aparecen como media ± SEM (n=5 animales por genotipo).

4. Evaluación de la actividad enzimática glutaminasa en animales $KOLPA_1$

Los niveles de actividad disminuyeron en los animales $KOLPA_1$ en la corteza parietal motora (***p<0.001, t-test) y en la PFC (*p<0.05, t-test). La actividad en estas regiones en mU/mg se redujo desde 160±8.2 mU/mg en PM de animales WT a 83±9.7 mU/mg en los $KOLPA_1$, y de 109±10.8 mU/mg en animales WT a 75±5.4 mU/mg en los $KOLPA_1$ para la región PFC. Sin embargo, cuando evaluamos la actividad GA en corteza cerebral total, no encontramos ninguna variación significativa entre ambos genotipos, lo que sugiere que cambios en subregiones concretas podrían verse enmascarados cuando se analizan las regiones cerebrales en su totalidad.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

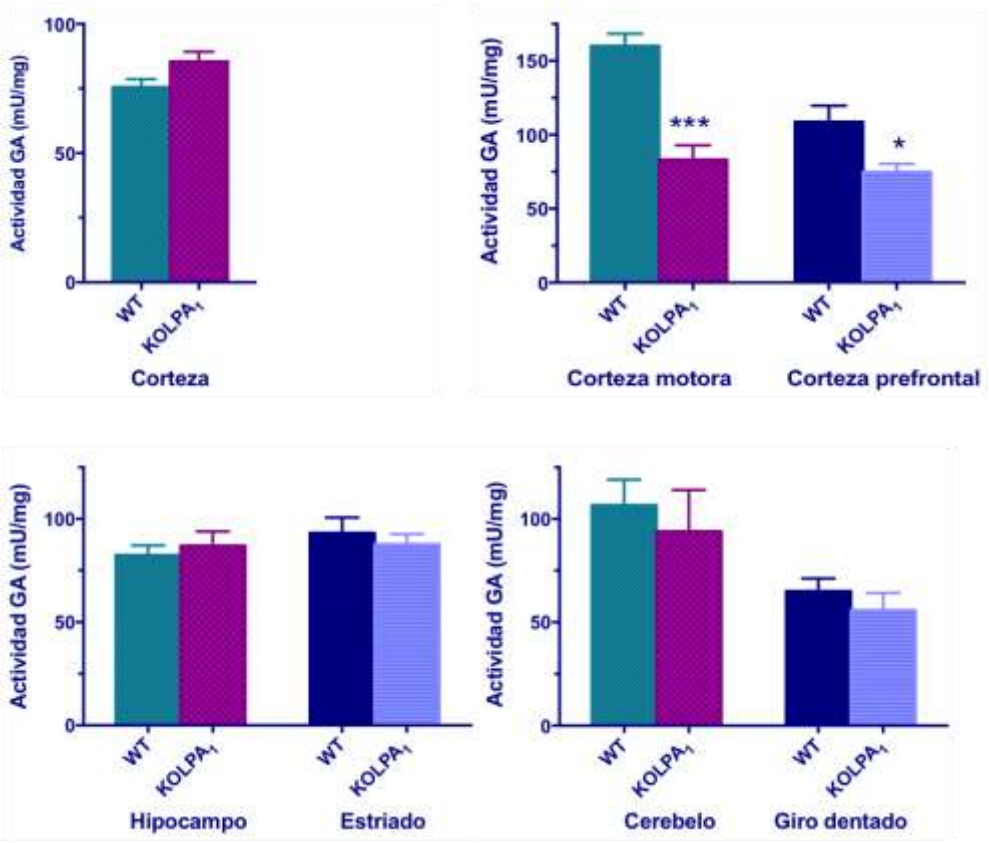


Figura 33. Determinación de la actividad GA total en las distintas regiones cerebrales de animales WT y KOLPA$_1$. Las regiones cerebrales aisladas fueron homogenizadas y las proteínas GA totales extraídas y solubilizadas, tal y como se describe en la sección de Métodos. La actividad enzimática GA fue ensayada midiendo los niveles de amonio producidos con el reactivo OPA. Se encontraron diferencias significativas en la PM (WT n= 9; KOLPA$_1$ n= 5) y PFC (WT n= 12; KOLPA$_1$ n= 8), pero no en hipocampo (WT n= 16; KOLPA$_1$ n= 12) ni resto de regiones cerebrales (número de animales comprendido entre 8 y 15 para ambos genotipos en el resto de regiones analizadas) ***p<0.001; *p<0.05.

Considerando en su conjunto los resultados de expresión de KGA a nivel de transcritos (qRT-PCR), proteína (transferencias Western) y actividad enzimática, parece existir una ausencia de correlación entre los niveles de mRNA y proteína/actividad en la mayoría de las regiones cerebrales analizadas, excepto en dos subregiones de la corteza cerebral: corteza motora y PFC, donde los menores niveles de mRNA correlacionaron con valores reducidos de proteína KGA y actividad GA. Sin embargo, en hipocampo (y en corteza cerebral total) la abundancia de los transcritos KGA no estuvo en paralelo con los valores obtenidos para proteína KGA y actividad GA. Como ya comentamos anteriormente en esta memoria, esta disociación entre niveles de mensajeros y de proteínas para isoenzimas GA cerebrales fue ya detectada en estudios sobre su implicación en el

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

mecanismo de adicción a drogas de abuso, en concreto cocaína (Blanco *et al*[1]., 2012) y en la diferenciación neuronal (Agostini *et al*., 2016). Por consiguiente, los mecanismos subyacentes a la gran disminución en los niveles de proteína KGA, fundamentalmente en hipocampo y corteza cerebral de ratones KOLPA$_1$ (excepto en corteza motora y PFC), deben ser básicamente postranscripcionales.

En la evaluación de consecuencias funcionales del inesperado déficit encontrado para la proteína KGA en regiones glutamatérgicas claves del cerebro, la actividad GA total no cambió en la mayoría de regiones de los animales KOLPA$_1$, aunque sí lo hizo de forma significativa en la corteza motora y en PFC. Por lo tanto, deben de activarse mecanismos compensatorios para mantener la actividad GA en aquellas regiones con una notable disminución de la proteína KGA. Entre esos mecanismos, podemos especular con la operatividad de modificaciones postraduccionales de KGA, a través de cascadas de señalización inducidas por LPA y con la participación de otros receptores LPARs distintos de LPA$_1$. Igualmente, una actividad local incrementada de las isoformas GLS2 (GAB/LGA) podría también cooperar en el mantenimiento de los niveles basales de actividad GA en los ratones mutantes. De interés en este punto, hay que destacar que la actividad KGA puede modificarse mediante la ruta de señalización Raf-Mek-Erk, que provoca una fosforilación de KGA en respuesta a la acción de varios mitógenos incluidos LPA (Thangavelu *et al*., 2012). En consonancia con nuestros resultados de actividad GA, el contenido cerebral de Glu en PFC e hipocampo de ratones KOLPA$_1$ no mostró variaciones significativas en relación con los animales WT (Harrison *et al*., 2003); sin embargo, la liberación de los neurotransmisores Glu y GABA inducida por K^+ sí disminuyó de forma significativa en ratones deficientes en LPA$_1$ (Harrison *et al*., 2003; Roberts *et al*., 2005).

Aunque la contribución de cada isoforma GA a la síntesis del neurotransmisor Glu se desconoce (Márquez *et al*., 2016), KGA es el transcrito más abundante en cerebro de mamíferos (Martín-Rufián *et al*., 2012) y estudios previos han sugerido que esta isoforma es la fuente principal del neurotransmisor Glu. De hecho, ratones mutantes nulos para el gen *Gls* y, por tanto, carentes de proteína KGA, mueren al primer día tras su nacimiento; sin embargo, los terminales presinápticos de las neuronas *Gls*$^{-/-}$ poseían cantidades normales de Glu. El

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

silenciamiento génico de KGA provocó un efecto moderado en la transmisión glutamatérgica, resultado que fue explicado por la acción de mecanismos compensatorios de síntesis de Glu (Masson *et al*., 2006). De esta forma, los autores concluyen que el déficit de KGA impacta fundamentalmente en la implementación de circuitos neuronales más activos, destacando así la relevancia de KGA en el desarrollo, maduración y diferenciación neuronal (Masson *et al*., 2006).

5. Caracterización de la morfología de espinas dendríticas en ratones KOLPA$_1$

La implicación de la señalización LPA en procesos de desarrollo del sistema nervioso y en la homeostasis de neurotransmisores ha sido demostrada previamente. Como se ha indicado, el LPA tiene un papel importante en la neurogénesis a través del receptor LPA$_1$ (Fukushima *et al*., 2007); igualmente, el Glu ejerce un efecto trófico que ayuda al desarrollo neuronal (McKinney, 2010). Por consiguiente, quisimos determinar si la ausencia del receptor LPA$_1$ y el fuerte déficit observado en la expresión de proteínas GLS podían afectar la estructura de las espinas dendríticas. Dado que el hipocampo presenta una notable infra-expresión de KGA, decidimos evaluar la densidad y morfología de las espinas dendríticas usando la tinción de Golgi-Cox en la región hipocampal CA1, concretamente en las neuronas piramidales del *stratum oriens* de CA1.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

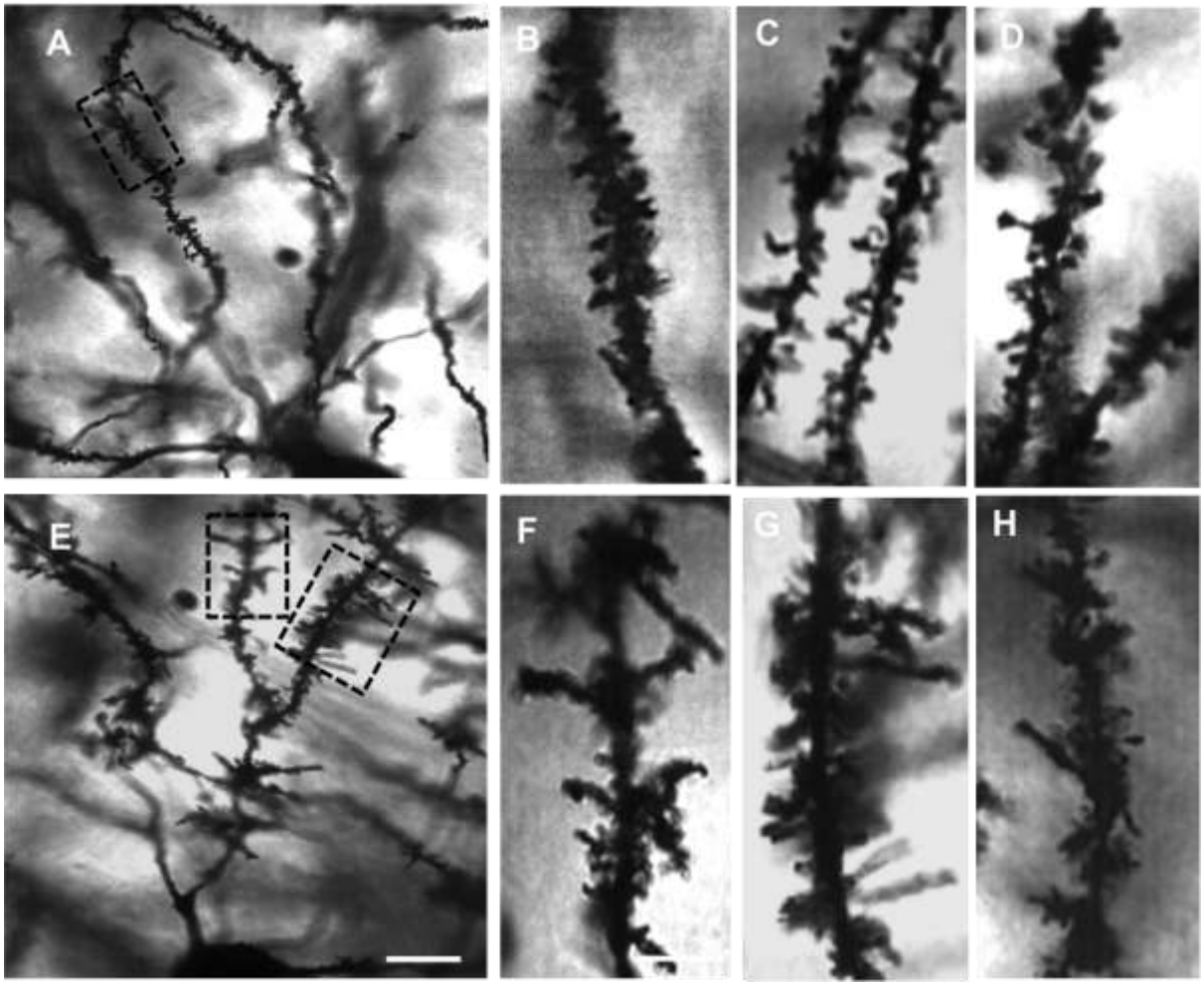


Figura 34. Tinción de Golgi-Cox de las dendritas basales de neuronas piramidales de CA1 en animales WT(A-D) y KOLPA$_1$ (E-H). (A) Panorámica de neurona piramidal de animal WT, y (B) detalle de la dendrita indicada. (C y D) Dendritas secundarias de animales WT. (E) Panorámica de neurona piramidal de animal KOLPA$_1$, los detalles se muestran en las figuras F y G. (H) Espinas dendríticas de un animal KOLPA$_1$. Las espinas dendríticas de los animales KOLPA$_1$ tienen una morfología más alargada y delgada en comparación con los WT. Barra de escala: Panorámias (A y E) 10 µm; B-D y F-H 5 µm.

Se realizaron diferentes medidas, entre ellas la densidad de espinas dendríticas, que se valoró como el número de espinas por cada 10 µm de longitud, en dendritas secundarias y terciarias. Aunque no se observaron diferencias significativas en este parámetro, ni en el ancho de la dendrita de animales WT y KOLPA$_1$ (p valor=0.097 y 0.086 respectivamente, t-test), sí se observaron alteraciones morfológicas en las espinas dendríticas.

Posteriormente, se llevo a cabo un análisis morfométrico que reveló la presencia de un mayor número de espinas alargadas, delgadas y de recorrido más

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

tortuoso (giros y dobleces) en los animales KOLPA$_1$ (Fig. 34, E-H) en comparación con los WT (Fig. 34, A-D), características de estadios inmaduros (Ebrahimi & Okabe, 2014). Se cuantificaron el número de espinas por subtipo (champiñón, delgadas, cortas y filopodia) y genotipo, observándose una mayor frecuencia de las tipo filopodia en ratones KOLPA$_1$ (***p=0.004, t-test) en detrimento de las tipo champiñón y cortas (Fig. 35). Además, la longitud de las espinas dendríticas reveló diferencias significativas (***p=0.0004, Mann-Whitney), con un aumento en el subtipo delgada en los ratones KOLPA$_1$ (*p=0.0104, Mann-Whitney) (Fig. 35). Otro de los parámetros que también se alteró fue el diámetro de la cabeza de la espina dendrítica, concretamente en las espinas tipo champiñón con un menor tamaño en los KOLPA$_1$ (***p< 0.0001, Mann-Whitney).

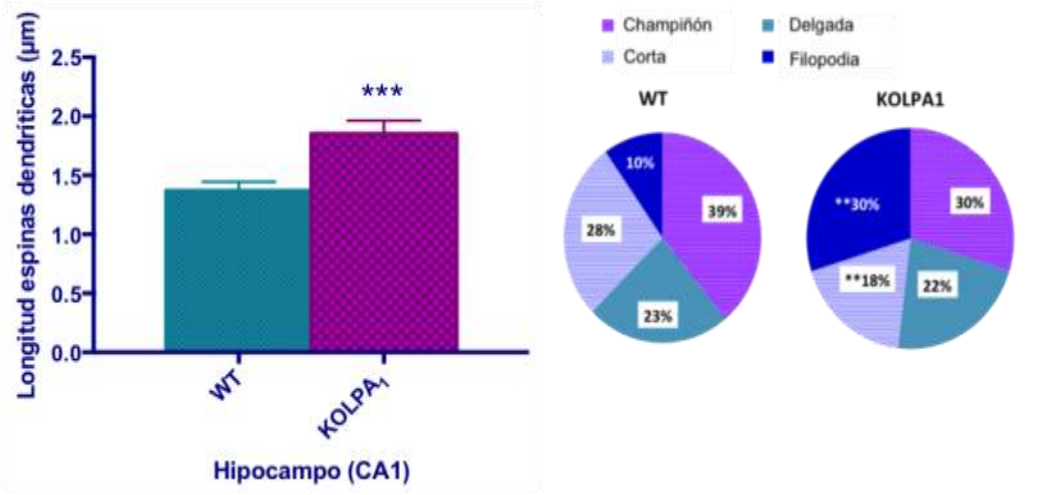


Figura 35. Diferencias en las longitudes de las espinas dendríticas y en la distribución morfológica de éstas en animales WT y KOLPA$_1$. Se observaron diferencias significativas en la longitud de las espinas dendríticas entre animales WT (1.4±0.9) y KOLPA$_1$ (1.9±1.1), y una mayor frecuencia de espinas tipo filopodia en los KOLPA$_1$ en detrimento de las espinas tipo champiñón y cortas. En promedio, más de 60 espinas de cada genotipo fueron analizadas (***p<0.0004).

Por último, en este análisis por tinción de Golgi-Cox, comparamos las longitudes de los distintos subtipos de espinas entre genotipos (Tabla 3). Se encontraron diferencias significativas para las espinas delgadas al comparar los animales WT *vs* KOLPA$_1$ (*p=0.0104, Mann-Whitney).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tabla 3. Análisis de las longitudes de los subtipos de espinas dendríticas en la región CA1 hipocampal de animales WT y KOLPA$_1$. Los datos representan la media de los rangos de longitudes±SEM. Se indica el número espinas dendríticas analizado para cada genotipo(n=123 WT; n=104 KOLPA$_1$) (*p=0.0104, Mann-Whitney).

Subtipo de espina dendrítica	WT (n=123)	KOLPA1 (n=104)
Champiñón	0.8-2 ±0.3	0.78-2±0.28
Delgada*	0.86-2.76±0.44	1.24-3.6±0.5
Corta	0.3-0.9±0.1	0.4-0.9±0.1
Filopodia	1.13-5.5±1.4	1.22-5.3±1.16

Estos resultados sugieren que la formación y/o maduración de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales de hipocampo está desregulada en el modelo KOLPA$_1$. Está bien documentado el papel modulador de LPA en la formación de sinapsis a través de la modulación de la dinámica estructural de las espinas dendríticas. Por ejemplo, en cultivos de neuronas de hipocampo el receptor LPA$_1$ se localiza de manera punteada en las espinas dendríticas y su sobreexpresión conlleva un incremento de la densidad y tamaño de las espinas (Pilpel & Segal, 2006). Nuestra hipótesis, a tenor de los resultados aquí descritos, en la región CA1 del hipocampo es que los animales KOLPA$_1$ poseen cambios morfológicos en las espinas de sus principales sinapsis excitatorias. Los resultados de la tinción de Golgi-Cox muestran unas espinas dendríticas hipocampales con un marcado fenotipo inmaduro en el genotipo KOLPA$_1$.

6. Análisis de la expresión de marcadores proteicos de espinas dendríticas

Para identificar la base molecular que subyace al cambio morfológico-estructural de las espinas dendríticas, investigamos si existían alteraciones en los perfiles de expresión proteica de marcadores dendríticos conocidos y de proteínas bien caracterizadas por su papel en la formación y modulación de las sinapsis establecidas entre espinas. Se examinaron diferentes marcadores como la proteína de la densidad postsináptica 95 (PSD-95) (marcador post-sináptico) y una proteína de vesículas, sinaptofisina (Syn; marcador presináptico). El análisis mediante

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

inmunotransferencias Western de ambas proteínas no demostró ninguna variación significativa en sus niveles de expresión entre animales WT y KOLPA$_1$ (Fig. 36 y 37).

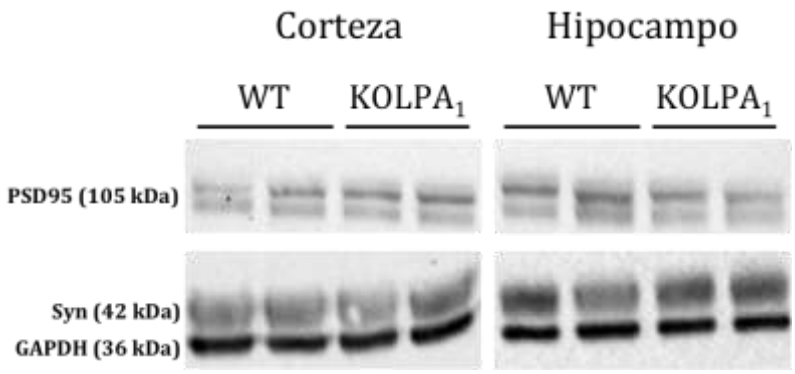


Figura 36. Análisis de la expresión de marcadores de espinas dendríticas por inmunotransferencias Western. Se llevó a cabo un análisis cuantitativo por densitometría de PSD-95 (105 kDa) y Syn (42 kDa), empleando como control de carga GAPDH.

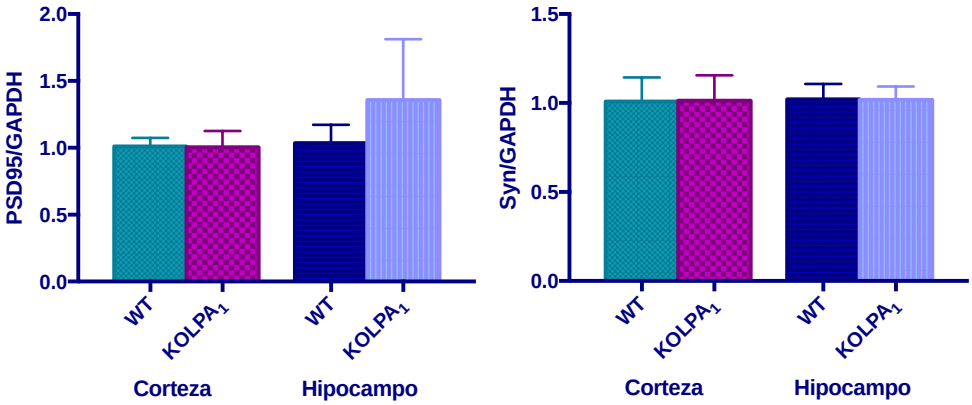


Figura 37. Expresión de PSD-95 y Syn en corteza e hipocampo de animales WT y KOLPA$_1$. A pesar de los cambios observados en la morfología de las espinas dendríticas, con un fenotipo más inmaduro en los KOLPA$_1$, no hay diferencias significativas en los marcadores proteicos analizados entre WT y KOLPA$_1$.

7. El silenciamiento génico de LPA$_1$ reduce la expresión y actividad gelatinasa MMP-9, pero no la MMP-2

Las metaloproteinasas de matriz han atraído recientemente mucha atención como importantes moduladores de la morfología de las espinas dendríticas, junto con otras proteínas constitutivas que se conoce participan en la formación de las sinapsis. Dado el importante papel que ejerce la metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9) en la potenciación a largo plazo, favoreciendo el alargamiento y contacto

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

de las espinas dendríticas (Michaluk *et al.,* 2011; Dziembowska & Wlodarczyk, 2012) (véase Fig. 38), se analizó la actividad de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9 en corteza e hipocampo, con la finalidad de ver si los ratones KOLPA$_1$ presentaban alguna alteración como base molecular de sus problemas cognitivos y de memoria. Con esta finalidad, se analizó medio hemisferio de ambos genotipos (WT n=8 y KOLPA$_1$ n=11) mediante zimografía en gelatina, observándose diferencias en los niveles de actividad proteolítica de MMP-9 en ambas regiones cerebrales (con una disminución significativa en los animales KOLPA$_1$, ***p< 0.0001), mientras que los niveles de MMP-2 permanecían estables (Fig. 39).

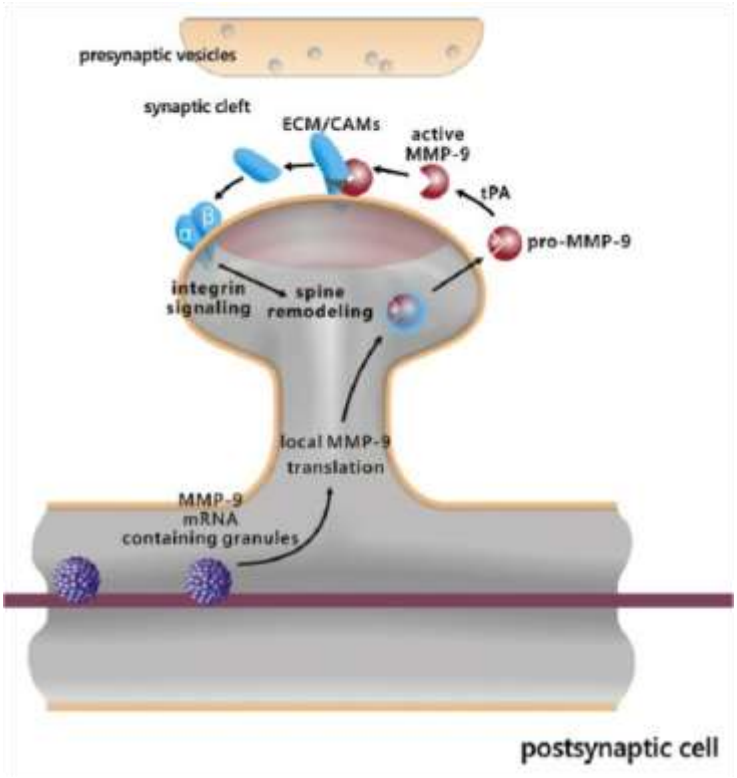


Figura 38. Modo de actuación de MMP-9. Tras un estímulo, MMP-9 se libera al medio extracelular donde se activa y ejerce su acción a través de integrinas-β1 promoviendo cambios en el citoesqueleto, que conllevan a la elongación de las espinas dendríticas y reorganización de los receptores NMDA (Michaluk *et al.,* 2011). Esta activación es breve, y rápidamente se inactiva por el inhibidor tisular de metaloproteinasas 1 (TIMP-1), lo que permite la maduración de las espinas y la formación de sinapsis activas (Wang *et al.,* 2008; Dziembowska *et al*., 2013; Stawarski *et al.,* 2014). Durante la maduración de las espinas se establecen morfologías asociadas con una mayor estabilidad, y mayor densidad postsináptica, como las espinas tipo champiñón (Hotulainen & Hoogenraad, 2010). Imagen tomada de Dziembowska *et al*., 2013.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

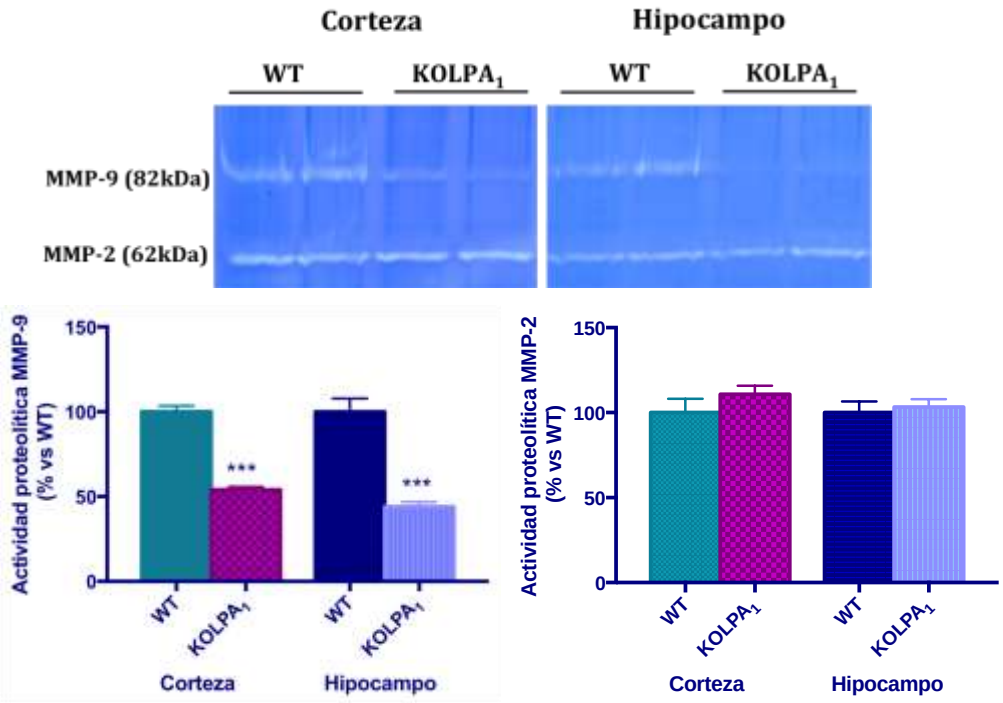


Figura 39. Zimograma de MMP-2 y MMP-9 en corteza e hipocampo de animales WT y KOLPA$_1$. Se analizó medio hemisferio de animales WT (n= 8) y KOLPA$_1$ (n=11) para estudiar la actividad de MMP-9 y MMP-2. Se observaron diferencias significativas en la actividad proteolítica de MMP-9 en ambas regiones cerebrales, con un descenso en la actividad de los KOLPA$_1$ (***p<0.0001), mientras que no se observaron cambios en la actividad de MMP-2.

Para comprobar si la reducida actividad MMP-9 observada en los animales KOLPA$_1$ se debía a una disminución de la expresión proteica, realizamos inmunotransferencias Western para evaluar los niveles de MMP-9 (tanto el zimógeno, 92 kDa, como la proteína activa, 82 kDa) en corteza cerebral e hipocampo. Los resultados obtenidos (Fig. 40) mostraron una disminución en la expresión de MMP-9 activa en los animales KOLPA$_1$ comparado con los WT (*p<0.05), mientras que no se observó variación en los niveles del zimógeno.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

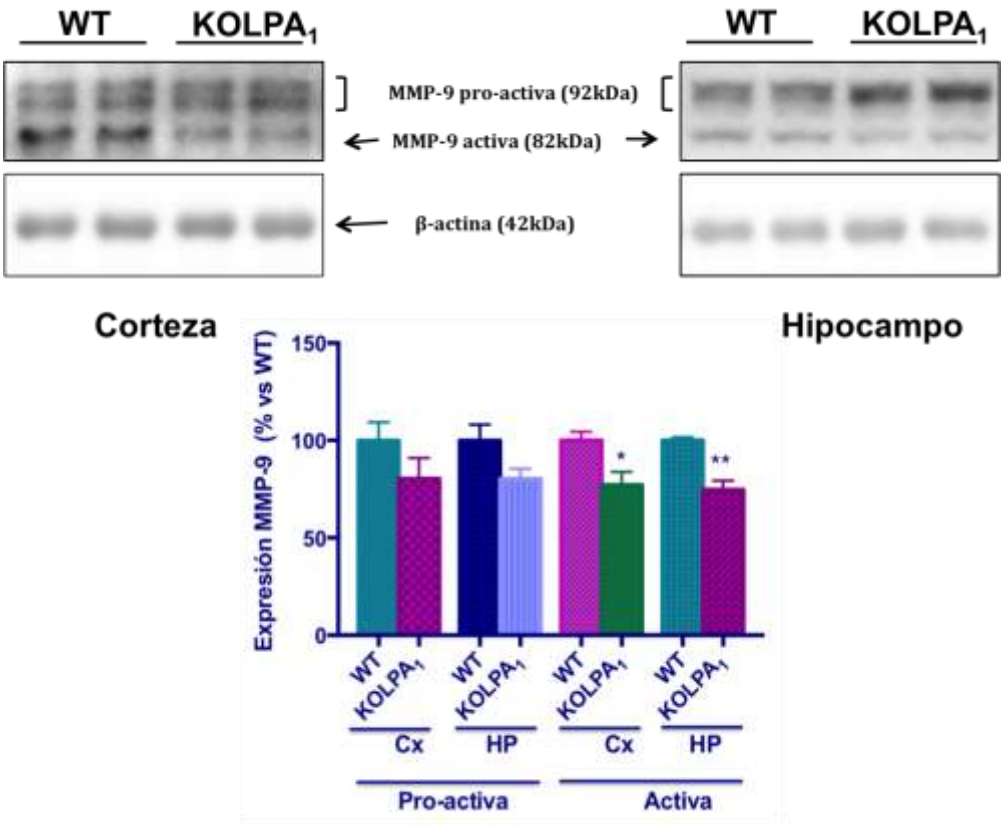


Figura 40. Inmunotransferencia Western de pro-MMP9 y MMP-9 en corteza cerebral e hipocampo de animales WT (n=4) y KOLPA$_1$ (n=5). Se realizó un análisis cuantitativo de MMP-9 pro-activa (92 kDa) y activa (82 kDa) mediante densitometría usando β-actina como control de carga. Los animales KOLPA$_1$ mostraron una reducción en los niveles de MMP-9 activa (*p<0.05).

Por último, se evaluó la actividad proteolítica del activador tisular de plasminógeno (tPA), encargado de catalizar el paso de plasminógeno a plasmina, donde la última actúa como potente activador de las MMPs (Van Wart & Birkedal-Hansel, 1990). Aunque el sistema tPA/plasmina ha sido implicado en numerosos aspectos de la función cerebral, incluyendo la remodelación de las dendritas en hipocampo (Pawlak *et al.,* 2015) y corteza visual (Mataga *et al.,* 2014) de ratón, además de participar en la activación proteolítica de MMP-9 desde su forma zimógena (Wang *et al.,* 2008), no se observaron diferencias significativas en su actividad entre animales KOLPA$_1$ y WT ni en corteza ni en hipocampo (Fig. 41).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

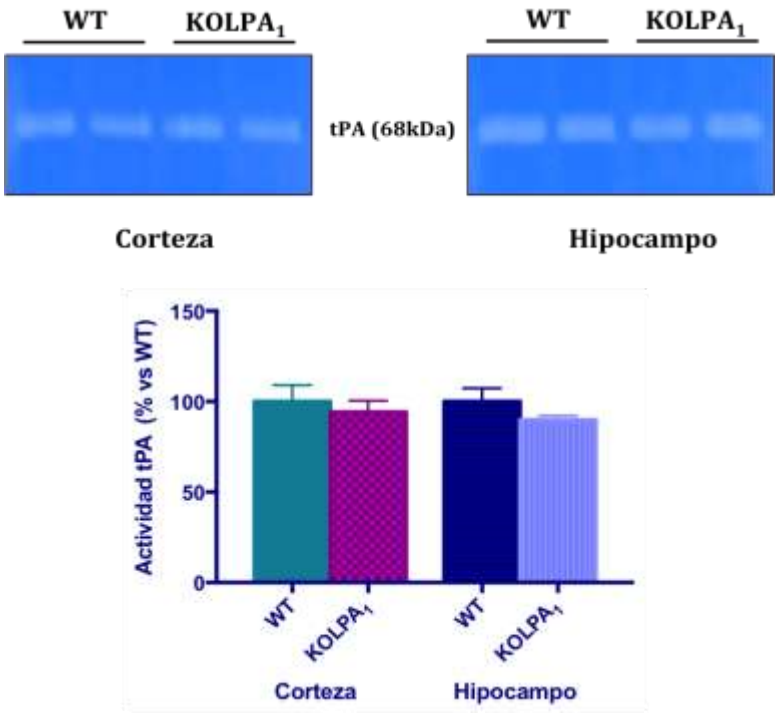


Figura 41. Zimograma de tPA en corteza e hipocampo de animales WT (n=4) y $KOLPA_1$ (n=6). El análisis por densitometría de la actividad tPA no reveló diferencias entre animales $KOLPA_1$ y WT.

Los resultados obtenidos apuntan a una participación significativa de la señalización LPA en la activación de MMP-9. Se ha descrito una relación entre LPA y MMP-9 en células de carcinoma hepatocelular, donde el LPA extracelular sintetizado por ATX, a través de su unión al receptor LPA_1, es capaz de activar diferentes cascadas que llevan a la inducción de la expresión de MMP-9, entre las que destacan la vía PI3K/Akt y PKC/MPAK (Park *et al.,* 2010). Estos antecedentes concuerdan con nuestros resultados en ratones deficientes para el receptor LPA_1 que experimentan una disminución en la actividad MMP-9. Sin embargo, los niveles de zimógeno no varían, disminuyendo exclusivamente los de MMP-9 activa, lo que podría implicar la actuación de terceros en esta vía. La plasmina es un inductor natural poco eficiente de MMP-9, pero puede activar a otras MMPs, como MMP-3, que ejerce una potente acción catalítica sobre pro-MMP9 (Ramos-DeSimone *et al.,* 1999). Así pues, podemos hipotetizar un posible papel de LPA_1 sobre la activación de MMP-9, que a su vez actuaría en la potenciación a largo plazo y en la adquisición de aprendizaje espacial, función en la que también se ha visto implicada MMP-3 (Meighan *et al.,* 2006).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Por otra parte, la implicación de MMP-9 (Rivera *et al*., 2010; Michaluk *et al*., 2011), y otras proteasas extracelulares como tPA (Mataga *et al*., 2004), en la remodelación de sinapsis, plasticidad sináptica y procesos cognitivos está ampliamente documentada. En neuronas, MMP-9 está localizada en los dominios postsinápticos de las sinapsis excitatorias; su inhibición se ha relacionado con déficits de memoria en paradigmas de aprendizaje comportamental (Nagy *et al*., 2007). Y, por supuesto, como ya se ha mencionado, MMP-9 es un regulador clave de la morfología de las espinas dendríticas (Michaluk *et al*., 2011; Dziembowska & Wlodarczyk, 2012). Los resultados mostrados aquí sobre MMP-9 sugieren que la reducción de su actividad en ratones KOLPA$_1$ podría deberse, al menos parcialmente, a una disminución de la forma activa provocada por mecanismos postraduccionales (disminución de su procesamiento proteolítico a forma activa o directa modificación de algún residuo sobre la proteína madura).

La reducción de la actividad MMP-9 podría explicar cambios a corto plazo de la plasticidad sináptica (con repercusión sobre las propiedades cognitivas y de memoria), debido a la ausencia de un adecuado proceso de remodelado de las espinas dendríticas en las neuronas hipocampales, y como parte del fenotipo neurofisiológico mostrado por los animales KOLPA$_1$. No obstante, MMP-9 ejerce una función dual en la morfología de las espinas: mientras que niveles locales basales de actividad MMP-9 promueven el alargamiento de las espinas y la potenciación sináptica concomitante (Wang et al. 2008), un exceso de actividad MMP-9, como las que acontecen en situaciones patológicas como el infarto o la epilepsia, provoca la transformación de las espinas dendríticas desde el tipo champiñón hasta protrusiones tipo-filopodio (fenotipo inmaduro) (Bilousova *et al*., 2009); de hecho, la inhibición de este incremento no transitorio de actividad MMP-9 provocó la remodelación de las espinas dendríticas hacia el fenotipo maduro tipo champiñón (Bilousova *et al*., 2009). De esta forma, nuestros resultados indican que una actividad MMP-9 reducida podría surgir como un efecto cadena-debajo de la ausencia de señalización Rho/ROCK inducida por LPA$_1$, ruta que se conoce produce la activación de enzimas proteolíticas como MMP-9 (Yu *et al*., 2014). Como una consecuencia, la falta de plasticidad sináptica, provocada por la remodelación de las espinas hipocampales ejercida por MMP-9, podría explicar los déficits

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

cognitivos y de memoria mostrados por los animales KOLPA$_1$. Sin embargo, otros autores han encontrado que la morfología de las espinas dendríticas se afecta por LPA$_1$ pero de manera independiente de sus tres principales cascadas de señalización, sugiriendo alternativamente que este efecto fue debido a interacciones con otras proteínas (el receptor LPA$_1$ tiene un módulo de reconocimiento de proteínas PDZ en su región C-terminal) (Pilpel & Segal, 2006).

8. Función de las isoenzimas GA en el desarrollo y la diferenciación neuronal

Por último, aunque se desconoce el mecanismo postranscripcional por el que LPA$_1$ lleva al silenciamiento de KGA en cerebro, la disminución de esta isoforma puede originar alteraciones en el desarrollo de las neuronas corticales e hipocampales que, seguidamente, pueden contribuir a notables déficits en el crecimiento de neuritas, axones y en la maduración de espinas dendríticas. De hecho, KGA se ha asociado a diferenciación neuronal y proliferación de células neuronales. Ambas isoformas GLS (KGA y GAC) aumentan durante la neurogénesis de células progenitoras neurales humanas (NPCs), y su patrón de expresión correlaciona positivamente con el marcador neuronal MAP-2 (proteína asociada al microtúbulo-2) (Wang *et al.,* 2014). Hay que destacar que estudios realizados con cultivos de NPCs humanas mediante silenciamiento génico de GLS con siRNA, sugieren un papel crítico de las isoformas GLS en la proliferación y supervivencia de NPCs (Wang *et al.,* 2014). Más aún, la inhibición de la actividad GA en cultivos de neuronas corticales embrionarias de ratón provocó inhibición de la neurogénesis (Velletri *et al.,* 2013), mientras que los niveles de mRNA y proteína KGA aumentaron de forma notable cuando células granulares del cerebelo se diferencian en cultivo (Thomas *et al.,* 1989). Este último estudio también demostró una sobre-expresión de KGA, en paralelo con la liberación de Glu dependiente de Ca^{2+} y la formación de neuritas, vesículas sinápticas y sinapsis (Thomas *et al*., 1989).

En los últimos años, se ha puesto de manifiesto la implicación de KGA en la reprogramación metabólica subyacente a la diferenciación neuronal. Así, durante la diferenciación *ex vivo* de neuronas corticales primarias, el ciclo Glu/Gln aumentó

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

de forma considerable en paralelo con incrementos significativos de los mRNAs de GLS y GLS2 (Agostini *et al.* 2016). Otro descubrimiento sorprendente de los últimos años es el relativo a nuevas localizaciones neuronales, distintas a la mitocondrial, reveladas para KGA. A través de interacciones con proteínas de andamiaje (*scaffold*), como la proteína BNIP-H (caitaxina), KGA es capaz de ser relocalizada desde las mitocondrias del cuerpo celular neuronal hasta terminales en las neuritas. La caitaxina se expresa abundantemente en hipocampo y cerebelo, y este envío selectivo ocurrió en células PC12 cuando se induce su diferenciación a un fenotipo neuronal, lo que apoya una función de KGA en el crecimiento y diferenciación neuronal (Buschdorf *et al*., 2006). Una segunda proteína que interactúa con KGA en cerebro fue descubierta posteriormente: BMCC1s, una proteína que está implicada en la regulación de la morfología celular (Boulay *et al*., 2012). En neuronas corticales de ratón, BMCC1s interactúa con el precursor de KGA evitando su envío a la mitocondria, lo que provoca su acumulación en el citoplasma. De esta forma, la proteína KGA puede circular en las neuronas a sitios distantes y no está confinada exclusivamente en la mitocondria; en lugar de ello, KGA parece esencial para el crecimiento de neuritas, formación/maduración de dendritas y establecimiento de nuevas sinapsis. Por consiguiente, podemos especular que un bloqueo del envío específico de KGA a regiones sinápticas, como el que cabría esperar tras la drástica reducción de su expresión en los ratones KOLPA_1, tendrá un impacto negativo en estos animales durante el desarrollo cerebral.

En conclusión, los resultados expuestos en esta segunda parte de la memoria, sugieren que LPA_1 provoca un impacto muy notable en la expresión de KGA, probablemente a través de un mecanismo postranscripcional. Este silenciamiento de KGA, junto con el efecto paralelo sobre la actividad MMP-9, puede ser la base molecular para la función de LPA en el modelado de la plasticidad sináptica y su efecto en los procesos cognitivos y de memoria. Se requieren estudios adicionales para averiguar los mecanismos concretos que conectan la señalización LPA_1 y la expresión GA en regiones glutamatérgicas claves y su relevancia en la función cognitiva y la memoria.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Conclusiones

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Se ha adquirido una construcción transgénica del consorcio International Mouse Phenotyping Consortium (IMPC) para el silenciamiento génico condicional del gen Gls2 murino. El vector de transgénesis sitúa los exones 2 a 7 entre los sitios loxP de reconocimiento por Cre recombinasa y rendirá animales KO nulos condicionales para las isoformas GLS2 en cerebro. Este vector de transgénesis ha sido incorporado en células madre embrionarias (ES) murinas por electroporación.

2. Las células ES murinas mutantes fueron genotipadas para comprobar la recombinación homóloga. Se procedió a su microinyección en embriones en estadio de 8 blastómeras y se obtuvieron animales quiméricos *Gls2*$^{tm1a/+}$. Aunque desconocemos el papel que pueda tener el gen *Gls2* en la embriogénesis murina, la ausencia de homocigotos *Gls2*$^{tm1a/tm1a}$ nos hace pensar que sea esencial en etapas tempranas del desarrollo.

3. La colonia heterocigota *Gls2*$^{tm1a/+}$ fue cruzada con animales que expresan la recombinada Flp para eliminar la *cassette* Neo y secuencias de ayuste alternativo y poliadenilación. Los animales *Gls2*$^{tm1c/+}$ fueron genotipados para confirmar la escisión. Actualmente, se están cruzando entre sí para seleccionar homocigotos y obtener la colonia de animales fundadores que se cruzarán con los animales Cre.

4. Se ha caracterizado un modelo animal transgénico KO nulo total para el receptor del ácido lisofosfatídico LPA_1. Estos animales presentan importantes déficits cognitivos y de memoria, si bien la base molecular de estas alteraciones no se ha caracterizado. Mediante una combinación de técnicas de biología molecular, inmunohistoquímicas y bioquímicas, hemos demostrado un dramático silenciamiento de la isoenzima glutaminasa KGA en corteza cerebral e hipocampo, y una drástica disminución en la actividad metaloproteínasa de matriz-9 (MMP-9) en ambas regiones cerebrales.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

5. Los déficits de KGA y MMP-9 correlacionan con notables cambios morfológicos en las espinas dendríticas de neuronas glutamatérgicas piramidales del hipocampo de los animales KOLPA$_1$, que presentan un fenotipo más inmaduro. Estas alteraciones en la morfología de las espinas afectan a la plasticidad sináptica y hacen prever la existencia de un menor número de conexiones sinápticas, lo que podría constituir la base molecular subyacente a las alteraciones en los procesos cognitivos que muestran los animales KOLPA$_1$.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Anexos

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Medios de cultivo para bacterias

Medio LB (Luria-Bertani)

Extracto de levadura	5 g
Bactotriptona	10 g
NaCl	10 g

El pH se ajustó a 7.4 y el volumen a 1 litro. A continuación se esterilizó en autoclave.

LB-Agar

Extracto de levadura	2.5 g
Bactotriptona	5 g
NaCl	5 g
Agar	7.5 g

El pH se ajustó a 7.4 y el volumen a 500 ml. Se esterilizó en autoclave. Se dejó enfriar hasta aproximadamente 50ºC y se añadió la ampicilina a una concentración de 50µg/ml.

2. Medios y soluciones para el cultivo de células de mamífero

Medio EF

Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; 4500 mg/l glucosa, glutaMAX, y 110 mg/L piruvato sódico)

FBS	10% (v/v)
Penicilina/Estreptomicina	1 mM
Glutamina	2 mM
Aminoácidos no esenciales	1 mM

Medio ES

Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; 4500 mg/l glucosa, glutaMAX, y 110 mg/L piruvato sódico)

FBS	15% (v/v)
Penicilina/Estreptomicina	1 mM
Glutamina	2 mM
Aminoácidos no esenciales	1 mM

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

β-mercaptoetanol 1 mM

Factor inhibidor de leucemia (LIF) 1000 U/ml

PBS 10x

$NaH_2PO_4.H_2O$ 2.28 g

KCl 4.6 g

$Na_2HPO_4.2H_2O$ 16.6 g

NaCl 87.7 g

El pH se ajustó a 7.4 y el volumen a 1 litro. Se esterilizó en autoclave.

3. Soluciones para DNA

TAE 50x

Tris Base 242 g

Ácido acético glacial 57.1 ml

EDTA 0.5 M 100 ml

Se utilizó EDTA 0.5M (pH 8) previamente esterilizado en autoclave. Se ajustó el volumen a 1 litro.

TBE 10x

Tris Base 121.1 g

Ácido bórico 52.3 ml

EDTA 0.5 M 20 ml

Se utilizó EDTA 0.5M (pH8) previamente esterilizado en autoclave. Se ajustó el volumen a 1 litro.

TE

Tris 1M 2.5 ml

EDTA 0.5 M 0.5 ml

Se utilizó EDTA 0.5M (pH8) y Tris 1 M (pH 8) previamente esterilizados en autoclave. El volumen se ajustó a 250 ml.

STES (Tampón de extracción de DNA)

Tris- HCl (pH 8) 50mM

NaCl 20 mM

EDTA 1 mM

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

SDS	0.1 %

Denhardt's 50x

Polivinilpirrolidona	1% (p/v)
Ficoll	1% (p/v)
BSA	1% (p/v)

Se esterilizan con autoclave los dos primeros en un pequeño volumen y luego se añade la disolución de albúmina esterilizada por filtración hasta completar 500 ml. Se hacen alícuotas que se mantienen hasta su utilización a -20ºC.

4. Soluciones para RNA

MOPS 10x

MOPS	0.2 mM
$NaC_2H_3O_2$	80 mM
EDTA	10 mM

Para la preparación de geles desnaturalizantes se utilizó agarosa al 1.5% (p/v) en 40.66 ml de agua. Cuando la temperatura descendió se añadieron 5 ml de tampón MOPS 10x, 3.34 ml de formaldehido 37% (p/v) y RedSafe 1x. El tampón de muestra se preparó mezclando 720 µL de formamida, 160 µL de formaldehído 37% y 180 µL de MOPS 10x. Una vez se prepararon las muestras, la mezcla se desnaturalizó 15 min a 62ºC y se enfrió 1 min en hielo.

5. Soluciones para proteínas

Tampón de carga de proteínas 6x

Glicerol	36% (v/v)
Azul de bromofenol	0.012% (p/v)
β-mercaptoetanol	5% (v/v)
SDS	10% (p/v)
Tris-HCl (pH 6.8)	350 mM

Tampón electrolito 10x

Glicina	0.19 M
Tris	0.025 M
SDS	0.1% (p/v)

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tampón de transferencia

Glicina	190 mM
Tris	25 mM
Metanol	20% (p/v)

TBS 10x

NaCl	90 g
Tris	121 g

El pH se ajustó a 7.5 y el volumen a 1 litro.

TTBS 1x

TBS	1x
Tween	0.1%

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Validación del vector de transgénesis

- In2Fw: Se une al intrón 2 y en sentido 5'→3' permite secuenciar hasta el intrón 3. Permite identificar la diana de *EcoR*V del fragmento de restricción de 1.2 kb. Los resultados obtenidos coinciden con la secuencia teórica tanto para la diana de la enzima de restricción, como para el fragmento secuenciado.

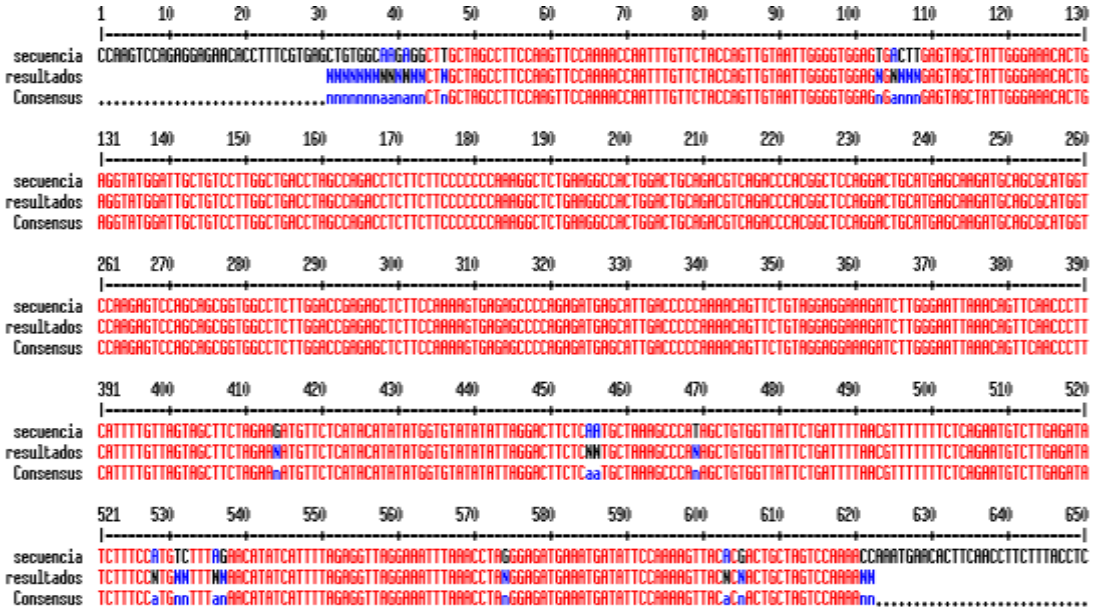


Figura 1. Resultado de la secuenciación del vector de transgénesis con el cebador In2Fw. En la primera línea aparece la secuencia teórica esperada y en la segunda los resultados de la secuenciación. Por último, en tercera posición, la secuencia consenso.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

- In5Fw: Este cebador se une al intrón 5 y permite secuenciar hasta el intrón 7.

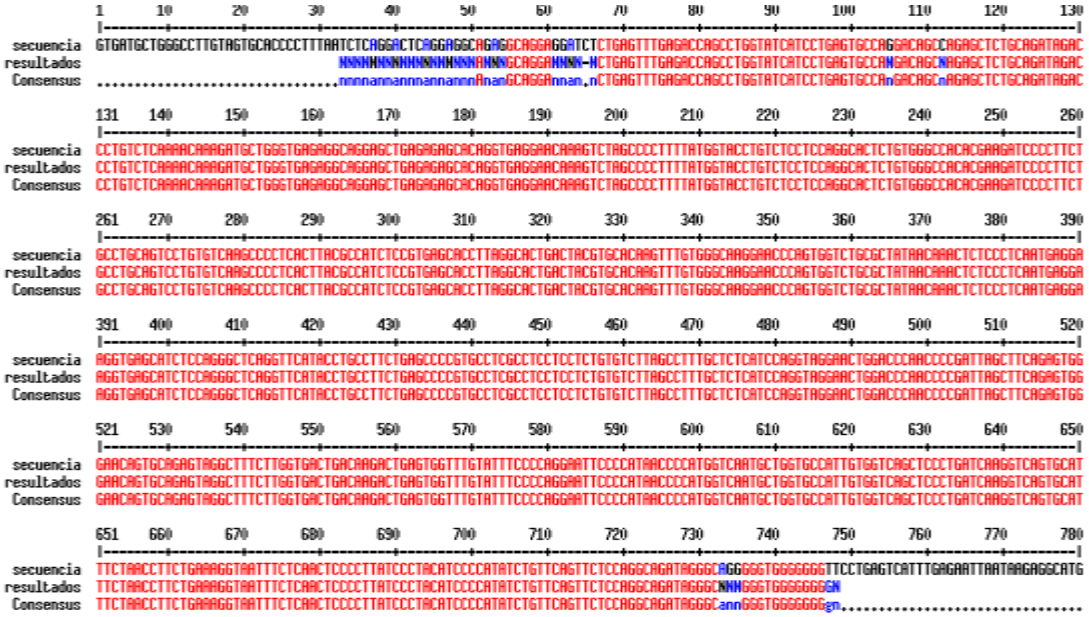


Figura 2. Resultado de la secuenciación del vector de transgénesis con el cebador In5Fw. En la primera línea aparece la secuencia teórica esperada y en la segunda los resultados de la secuenciación. Por último, en tercera posición, la secuencia consenso.

- LacZFW: Se comprueba mediante análisis de secuencia la presencia del fragmento de 2.5 kb, ausente en la digestión con la enzima de restricción *Sac*I. Para ello se diseña un cebador, LacZzFw, que permitirá confirmar la integridad del vector de transgénesis.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Figura 3. Resultado de la secuenciación del vector de transgénesis con el cebador LazZFw. En la primera línea aparece la secuencia teórica esperada y en la segunda los resultados de la secuenciación. Por último, en tercera posición, la secuencia consenso.

Genotipado de las células ES murinas mutantes resistentes a G418

- Int1Fw y Lar3Rv: Los cebadores secuencian la región específica de la *cassette* transgénica. El Int1Fw reconoce al intrón 1, mientras que Lar3Rv es homólogo a la secuencia En2SA del vector. En esta secuenciación se identifican el intrón 1, la región FRT (azul) y el En2SA (rojo). Los zona de reconocimiento de los cebadores aparece subrayada.

tccacctgagtgaggtagacatcctatatctttattccatagataagtaatattaagtgggcttcctaaaggcgcataacgataccacgatatc
aacaagtttgtacaaaaaagcaggctggcgccggaaccgaagttcctattccgaagttcctattctctagaaagtataggaacttcgaaccc
tttcccacaccaccctccacacttgccccaaacactgccaactatgtaggaggaaggggttgggactaacagaagaacccgttg

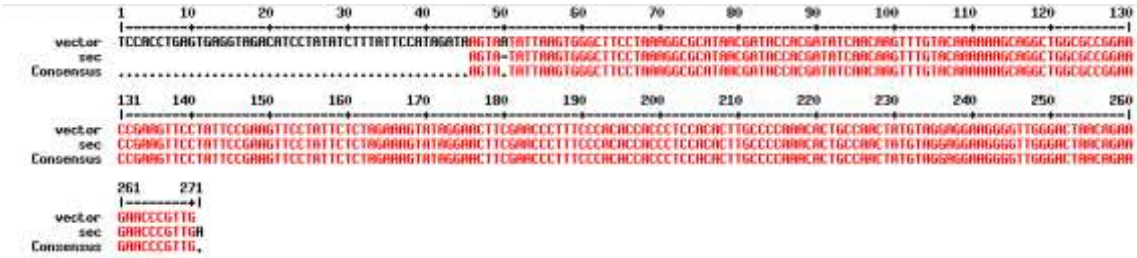


Figura 4. Resultado de la secuenciación de las ES resistentes a G418 con el cebador Int1Fw. En la primera línea aparece la secuencia teórica esperada y en la segunda los resultados de la secuenciación. Por último, en tercera posición, la secuencia consenso.

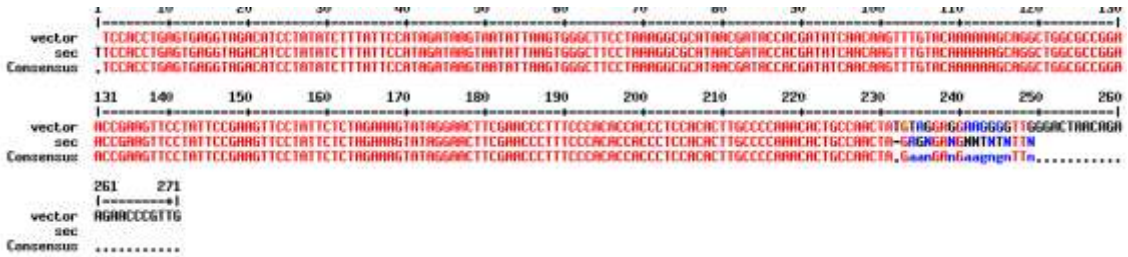


Figura 5. Resultado de la secuenciación de las ES resistentes a G418 con el cebador LaR3Rv. En la primera línea aparece la secuencia teórica esperada y en la segunda los resultados de la secuenciación. Por último, en tercera posición, la secuencia consenso.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

- NeoFw: Permite secuenciar la región correspondiente al gen *neo*^{r} del vector de transgénesis.

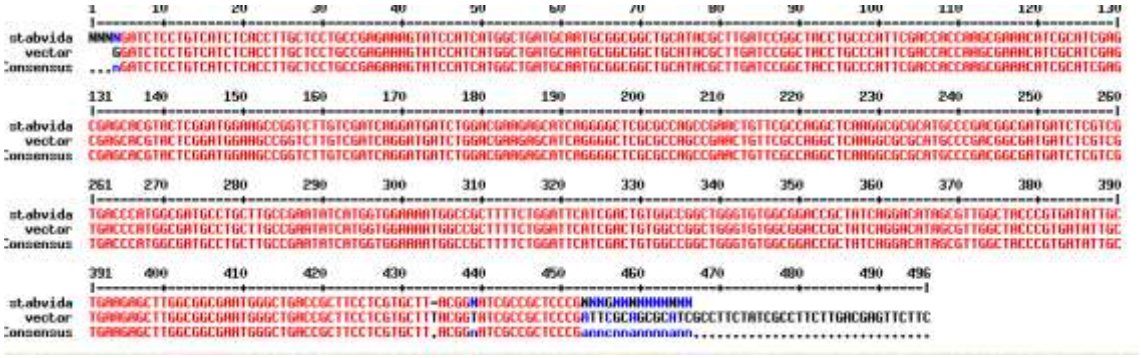


Figura 6. Resultado de la secuenciación de las ES resistentes a G418 con el cebador NeoFw. En la primera línea aparece los resultados de la secuenciación y en la segunda la secuencia teórica del vector. Por último, en tercera posición, la secuencia consenso.

- Ex7Fw e In7Rv: Los cebadores secuencian la zona flanqueante al sitio loxP del brazo corto de homología. A continuación se indica la zona amplificada, donde en rosa se muestra parte del exón 7 y en rojo el loxP. Subrayado aparece la zona de unión de los cebadores.

ggaattccccataaccccatggtcaatgctggtgccattgtggtcagctccctgatcaaggtcagtgcatttctaaccttctgaaaggtaatttctcaactcccccttatccctacatccccatatctgttcagttctccaggcagataggg cagggggtgggggggttcctgagtcatttgagaattaataagaggcatggaaaaaatgcatcaggaagtcctgtgagatggcgcaacgcaattaatgataacttcgtatagcatacattatacgaagttatggtctgagctcgccatcagttcaagagccaaatgccaagggcagggggaggacaacaccatcaggc

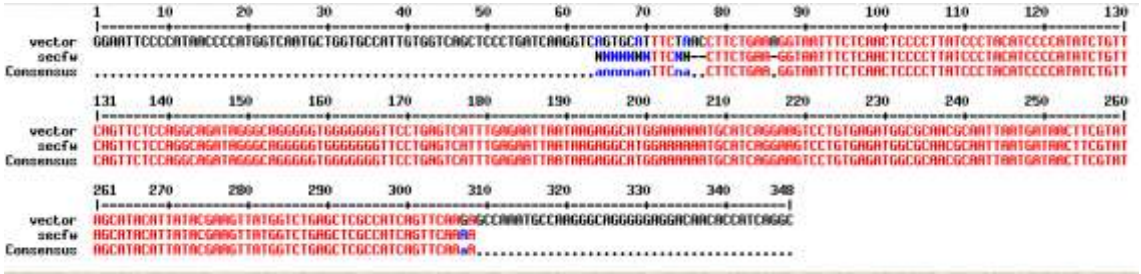


Figura 7. Resultado de la secuenciación de las ES resistentes a G418 con el cebador Ex7Fw. En la primera línea aparece la secuencia teórica esperada y en la segunda los resultados de la secuenciación. Por último, en tercera posición, la secuencia consenso.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

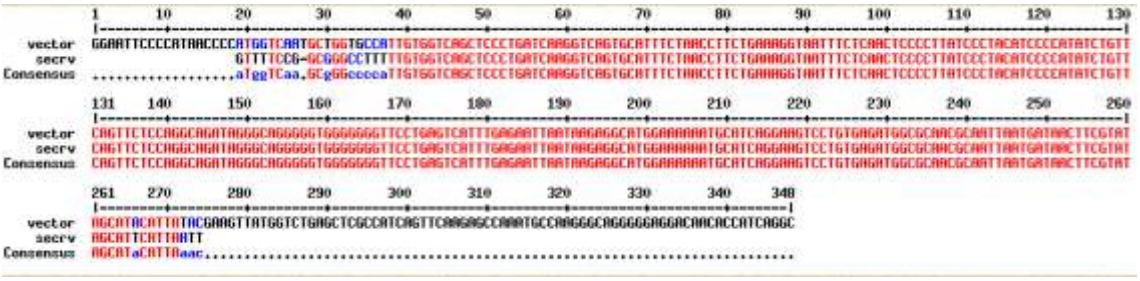


Figura 8. Resultado de la secuenciación de las ES resistentes a G418 con el cebador In7Fw. En la primera línea aparece la secuencia teórica esperada y en la segunda los resultados de la secuenciación. Por último, en tercera posición, la secuencia consenso.

Secuenciación del fragmento correspondiente al alelo tm1c

- Int1Fw e Int1Rv: Los cebadores (subrayados) secuencian la región donde ha actuado la recombinasa FLP. Se confirma la secuencia única FRT que resulta tras la acción de la recombinasa (azul) y el sitio loxP (rojo).

tccacctgagtgaggtagacatcctatatctttattccatagataagtaatattaagtgggcttcctaaaggcgcataacgataccacgata
tcaacaagtttgtacaaaaaagcaggctggcgccggaaccgaagttcctattccgaagttcctattctctagaaagtataggaacttcgtc
gagataacttcgtatagcatacattatacgaagttatgtcgagatatctagacccagctttcttgtacaaagtggttgatatctctatagtcg
cagtaggcggttagtttctaactcactgcagacgcagaatgtgggaacagtcagacggatgctgtgtttccatctcgtccccatcctcacg
ggaaacacaaagacacacaccattgctggatgcactctgtttccagtgtttgccggacatcagtacgtgcaatgatttaggaggtggctcg
aaataaaggactgaaaagttcagagttccttttaaaagagactagagagtcagattggcaacctctcgcactggggtggaagttaggatc
acagaacctgccagatggt

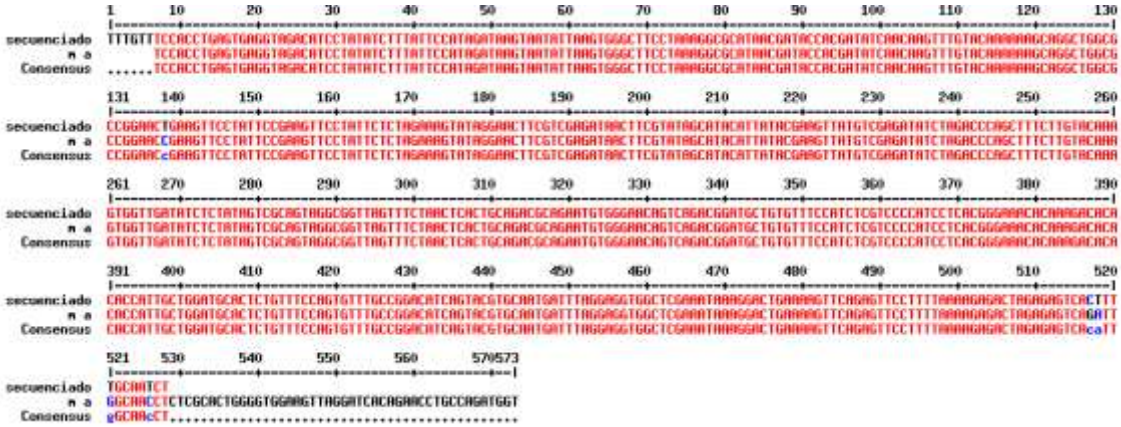


Figura 9. Resultado de la secuenciación del fragmento tm1c amplificado con los cebadores Int1Fw e Int1Rv. En la primera línea aparece el resultado de la secuenciación y en la segunda la secuencia teórica esperada. En tercera posición, la secuencia consenso.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Estrategia empleada en el Southern blot para identificar las células ES murinas transgénicas

A continuación se incluye la secuencia teórica de las células ES murinas que han incorporado la *cassette* transgénica por recombinación homóloga. Subrayado en rojo aparecen las secuencias de reconocimiento de la enzima *BstE*II, y en azul las regiones de complementariedad de lo cebadores BstE-Fw y BstE-Rv. Cabe esperar dos fragmentos de restricción, uno de 16 kb correspondiente al alelo mutado y otro de 9 kb del alelo WT.

Figura 10. Estrategia Southern. La enzima *BstE*II corta en la región 5' flanqueante del gen *Gls*2 y en el exón 2. Las flechas rojas indican la zona de hibridación de la sonda empleada, en la región 5' flanqueante del gen.

Aclaraciones:

- Región 5' del gen *Gls2,* no incluida en el vector de transgénesis, adyacente a la zona de homología del brazo largo. En esta región se encuentra una de las secuencias de reconocimiento de la enzima *BstE*II.
- Secuencia correspondiente al exón 2 del gen *Gls2,* incluida en el vector de transgénesis. En este exón se encuentra la otra diana reconocida por la enzima de restricción.
- Secuencia del vector, correspondiente a la trampa génica y al gen *neo*^{r}.

ACATAGCAGTTCACAATCATATGTAACTCTGGTCACCTCTCTGGTCTCCAGAGGC
CCCAGGTGCGTACACACACATTCACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACA
CACACGTAAAACACTATACAGACAAGAGGGGAAAGCCAGGCTTGGTGGCACACACCTTTAATACCAGCAC
TTAGAAGGCACAGGAAGGTGGATCTCTGTGAGTTCCAGGCCAGCCTGGGTTACAAAATGAGACCCTATCT
CAAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCACCAACAACAAAAACAACTTTAAAAAACATACTGGGGGAGTGG
GGGGCTGGAGAGATGGCTCAGCGGTTAAGAGCACTGACTGCTTTTCCTCTTCCGGGGACAGTGATTAGAG
GCACTCAGGATGGTCCAGCGTTTGACAAACTCTCGTAGGCTTTCCTACAACACAGCCTCTAACAAAACTA
GGCTGTCTCGAACCCCTGGCAACAGGATTGTTTACCTCTACACCATGAAGGGTGGGAAAGCACCTAAATC
CGCATGTGGTGTGTCCCCAGGCAGACTGCAAGGGGTTCGTGCTGTGAGACCCAAAGTCCTTCTGAGATTG
TCTAACCAAAGAAGCATGTCATGACGCAGGGCCTATGATGGTTCCATGTGTGCCAAGTGTGTCTGTGACG

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

GGATCAAGCGGGCTTTCCTTATTGAGGAGCAGAAAATCGTTGTGGAAGTATTGAAGGCACAAGCACAGAG
TCAGAGAGCAAAATAGATCTGCAGCTTTTTGCACTGACTGCTCTTCCAGAGGTTCTGAGTTCAAATCCCA
CAACCACATGGTGGCTCAGAACCATATGTAATGAGATCTGATACCCTCTTCAGGTGTGTCTGAAGACAAC
TACAGTGTACTTACATATAATAAATAAATAAATCTTTTTTAAAAACCAGACTAGGTAGAGATCCATTGAG
AGAGATACCTGGGGTTCACCCTTTATTCTTCACCTGTGTACAAGCTTGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
CTCTCTCACACACACACACACACACAGATACTAATGTTGAATTGTTGAATTGTTTATACTGAGTATTTGA
GAGGCTCTTAATTGAATCAGGCACGGCGTCACAGACGTGTGTAATCTCAGCCACTCTGGAGACTTCGGCA
GGAGGCAGCAAATTTGAGCCCAGCAATATAACTAGTTCCTGTCTCATAAACCAGAACCATGGGGCTGGGA
CGGTGCTTACCTGGCAGGCCAGAATCCTTTGGTTCATTCCCTAGCCTGGAATGAAGCTGGGAAGGTGATG
TAGGTCTACTCTAATCCCTGTACTTGAGGTAAGCAGAAGAAGCAGAGAATCAAGGGCTTCCTTGGACCAC
AGGTTCAAGGGCACTCCTGGAGACACCCAATCTGAAAAGCAAAAGTTTGCTTTGAGGACAAAGTCAGGAG
TGGGGCAGCAGACTGTAGACTGTGAATTAGAGGAAGTGCTCTGGATAAGACAGCAGATAAGCCAGAGAGG
GAACGGCTAACAGAAGGGAAATCAAACAGAAGGTCCACCTGGTTTCAAACCAAACACACCCTCTAAACTG
TAAGGCAAAGAGCTGCTGTTCTAGTAAACACAGAAACATGGCTTCGATGTTGATTTTCCCATGGTTGCAT
TTTGTTTGTGGCAAGGTCTCCTTGCACAGCCTCACCTGACTTGCACTCCTGTCCTGCCTAAGCTTCTCAG
ATGTTGGGATCCACAAAGAGTATACTGCCACCATTCCTGGTTATTTAAATTCAAAAATTAAAAGTTTTGC
AGTGCTGCCTGGGCAGCTCAAGAGACAGCTCCCAGTACTATCTCATAGCATAGAAAACTCTTTTACAAGT
GAGGTAGGTTTGGTTTTTTGTTTGTTTGTTTGTTTTGTTTTTAAAGAATTATTTATTTATTTATTTATTT
ATTTAAAAGATTTATTTATTTTTATTGTATATAAGTACACTGAGACACTCCAGAAGAGGGAGTCAGATCT
CATTACAGATGATTGTGAGTCACCATGTGGTTGCTGGGATTTGAACTTCAGACCTTTGGAAGAGTAGTCG
GGTGCTCTTACCCACTGAGCCATCTCACCAGCCCCAAGAATTATTTATTTAATGTATGTAAGTACACTGT
CTCTTCTTCAGACACACCAGAAGAGGGCATCAGATCCCATTACAGATGGTTGTGAGCCACCATGTGGTTG
CTGGGAATTGAACTCAGGACCTCTGAAAGAGCAGCCATCTCTCCAGCCCCCAGAGGTAGTTTTCCTCCAG
TTGTTAATTCAGTTGTTAATTTTGGAGGAGAAAGCTTGTAATCAGAGATTTCTGTCTAATTTCTGGCTCT
GGGTTATCTTATGCAAGTAGTCTTAACTTTCTTTTAAATAAAAGCTTAAAAAAAACCCACACATTTAAAA
AAAAAACATGCATACATTTATCGGGGGCTGGAGATATGGTTCAGTGGTTAAGAACACAGATTGCTCTTCC
GAAGGTCCTGAGTTCAAATCCCAGCAACCACATGGGGGCTCACAACATCTGTAATGAGATCTGACACCCT
TTTCTAGAGTGTTTAAAGACAGCTAGTGTACCTATATATAATAAGTAAATATAATGTATATAATAATAAT
AAATAAGTAAGTAAATAAATCTTTAAAAAAACCAGCTGGGCGTGGTGGCACATGCCTTTAATCCCAGCAC
TTGAGAGGCAGAGGCAGGCAGATTTCTGAGTTGGAGGCCAGCCTGGTCTACAAAGTGAGTTCCAGGACAG
CCAGGGCTATTCAGAGAAACCCTGTCTCGAAAAAAAAAAATCTTTAAAAAAACATAACAAACAAAAACCC
CCACATTTATCTAAGTGTGTGGGGGGGTTTCATGAGAACCATTGTCTGAGTAATTATCAGGTTTGGGAAC
AAGAGCCTTTACCCAGTGAAGTGTCTTGGTTCCAATTTGGTTTCCTCTTTTCAAAACAAACCTAGTAACT
GCTTCTTTGGCCACTGCTAGGGGAAAATAAACTAACTGGTTGGCATAGCATACACATGCAATAATAGTTG
TTAATATAATTCCTGCTAAGTCAAAGTGCTGTGAGGGCTGAGGTCAGGTGAGTGAAAGCTTTCGAAGCCC
ACGCTGGCCTTGGACTCTTTCAGATGACGTTGAACTACTGACCCACTTGTCTCCACATCCCTGGCGCTGG
Gactccaggaatgctgaccaccacatttttaattctcctaaattttgtgcattttctccactacaaacca
agaccacacctttaatcccaacactctggagcctaaagtaggtggatctgagagtttgaggtcaggctgg
tctagctcgtaagttctaagagatacggagaggccaggtcttaaaactaaaaacaattgggggag
cacgtatatgttttgtgtttctttgctttttttgtcgtgtgtgtgtgtgtgtttgtgtgtgtgtgcacgcg
caccggcatgcgtgtggtgttgcacacccctgcaattctagcacttgagaagttgaggtagaaggttggc
cacgaattcaaggccaacacgggctacaaactgagtactacggcaacaagggctatatctcaaagccctg
tttctaaaacaacaataaaaaaagatttcagccggcccagcacttgggaagcagaggcaggcggatttct
gagttcgaggccaggctggcctacaaagtgagttccaggacagccagggctatacagagaaaccctgtct
ggggggggtgggggggggggaagattttgagttcactggcttattttaatacgtgaactttagagaaagag
aactttagagagagactataagtcctccgcagccaccaaatgacctaagaacctgggctccatgacgcct
agcaatgaagcgcggcgggctgcttctggaccgtctttctgtccactcagcgccagcgcgcatccgtgat
tggggtgtttgcagcccgcaccgcctgcctgtaagtgtgcactggccacccctggccttcgaacatggaa
ggtcactacgtggctcccgcatcccgctcgctctcatctctctttgaaagtgtggcgttttcatctgcac
cagagcactccgtcgtccccagccctggcgcgtttccacgaactccgactgcgcagaggccgatcctctc
cccgccaaagctctgacgcgcgccggtgtcccgactgtcccagcctcccgcgcctttccccgcctcccag
cgttcctcctcctcagtgattggacgcggttcctgtccctttgactccagaccacgcccctccccacc
cagccgcctccagcttctcctcaatcgaacccgtggcgctcctggctggaggctgtgaggggactatggg
tgtacctgcgggatccgagtcgtcccggactggcccctccccggaccccaaccactcccaccgggccggt
ccttcccccccccaccccccccccgcaggctccactggccccaggactgctcccgggctcctagtctcgc
ccgccactcttccgcccctccctcctcgccgccgctcgcacgtctggagcgcccgggccgagcgggtggc
gcgccgggggcatgcgctccatgagggctctgcagaacgcgctgagccgcgcgggcagccacggtcggcg
gggaggctggggtcatccgagccggggcccgcttctgggcaggggcgtccggtactacctcggtgaggcc
gcagcgcagggcaggggacgccgcacagccaccagccgcagcactcggatcagtaaggctcgcgggaca
ggggcaggggacaggctggctcccactcccactgtcgttctcgctagctccctgggagtccccttcccca
gagagcgagcgcatctcatctcctctccgcgctcactagcctgcgatgccttttccttagatgtggggc

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

tttgggtccgccgcgctcgggcggtcaggtgctgtccgccgcgctcgggcggtcaggtgctgtccgcccg
ggagggcgtttgggcaggtcggtcttcgagatgatgcctgtccaaggtgcgtacttatttgggaacgcag
atgggcgcggagtgttgcttggtgcacgtgtctgagtgcagggccgagtgcacacctgcccatccccagc
ctctcttctctggtcccagtattttagggaattttgtggatatcgaacagcttcctgccccaggtccaag
tgcgcttgggtctgactgtgtggggtttcttgtctctgcctgtcgtcagtgggtaatgtgcggtgtgcgt
cattgctgatgcgcacgtaggtgcgtatgtgtccggagtgtttttgtagcagagcttaaccgtggaatat
cttatatgctggcaaaacactgataatcaagtttccaacttggttttggaatgcgttgattattcataaa
tgagaaaattgtgagacagttcctaaaccagtcagctattgcgttgctctgcctctctaaattgaagtgt
ttttccccttttggggccatcttcaacccaggaagtcgaccccccccccccccagcatacattgcccaggaa
tgcttagtagctgggctttctctccagccccaagaggagtgttttcaaagcatgaaatttgttatcctca
gacatccagctggacgttgtcctggtagctcctgcctcattatggcagtataggaaatggaccgtttttt
ccctatcatatcagcttagtgatatttagaaacatatgcacaccataattaaatgaaccagactgacaca
gcaaactacctcaacaccaataaatatggttgggtaagcaaataccatttgcttatccgttcccttgtaa
gacctttggggtgaggagccagaggcatccctgagtcctccttacgcatcacaattcactgcagtatgtg
acagaattgtgttgttgtttgttttttcaagacaggctttctctgtgtagccctggctgtcctggaactc
actctgtaacccaggctggcctcaaactcagagatccatctgcctccacctccccagtgctgggattaaa
gtcatatggcactactacctggatgtgactgaatatttgtaggagacctagttttttgtggctgcttgtg
ttccagggaactaattggtaaaggtcttaaaccttggctccctttggaaggtaaaggaggttggcaaaga
ggaaatacattctgattattaattctaataattctgattatttaaaagtatatagtttagggcttcagac
ccagacattcagagtacttgttactctggcaaaggacttggatctgatttccagcacagcacgtgatggc
tcacaaccatctgtaaatcccagggactcacatgggcattcatacacacacaaatcttaggaaacactta
aaaataaaatacttgccaggcgtggtggctcatgcctttaatcccagcactcgggaggcagaggcgggca
gatttctgagttcaagggcagcctggtctacaaagtgagttccaggacagccagggctacacagagaaac
cctgtcttaaaacaaacaaacaaacaaacaaacacctaataaaaccaaaatacttagcttcgttttattc
tgtttttaaaaagaatactgtgataggtgctagagaggtggctcagaagtttaaaacacttgatactttt
tgtttgtttctttctttttttctgagacaaagtttctctgtgtaaccctggctgtcctggaactcactcag
gactgtcctcaaactgacaaataccctcctacctcttcttcccagtacttccaaggctgagattgaaggt
gtgtgccaccaccatcctgcttggtttatgaacttttttaaaaatgtatataggtgttttgctttgtatat
gtgtctgtgtaccacatgcaagcctggaacttgctgagatcagaggaggtgttggatcccctgaaactgg
agccactacatgggtattaggaattgaacccaggtcctctgtaagaacaactgctcttaaccactaagct
agctcttcagccctggagtatgtgatactcctgaagagggcccatgcccagtttccagcacccacttggt
ggttagcgcaactatccataactctagttccagggtacctggtttgttctgacttctcagggtaccaggc
tgggtgtgttggcctttagtcccagtattctggaggcagaggcagaaggatttctgtgagttccaggact
gcctgaactacatagtaagttctgagatagccaggcctacatagaaagacccttagaacaaacaaacaaa
atcctagataagtcaaagatgaaaataaaaaccccagtattagagataactagttaatactgtgatataa
ccatatgtatcttatatatgttatgtatgtatgtgcttgtaatttaacaaaaataaaattatgatattca
tagtaattggtaagctatgttttccatttatgaatttatttttaattgatctttagtgtaagcatatgag
taccagtgtgccacatgttcatgtcagtggacaactttgtggaattggttctttccttctacctttacgt
ggcttctggggtttcatgggtcaaactcactgccagagttgcatagcaagcacttttttctgcggagcca
tcttgcttaccctatattcacttttttaaatggctttctaaaagttttattttgccgggcgtggtggctc
acacctttaatcccagtacttgggaggcagaggcaggcggatttctgagttcgaggccagcctggtctac
aaagtgagttccaggacagccagggctatacagagaaaccctgtcttgaaaaaccaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaacccaaaaaacaaaaaaaaaaactgtctaagctaagcatgatggtgcatgctttagtctt
agcacccaagaggcagaggcaggtggatccctgagttcaaagccagcctggtctacagagtgagttccag
gacagccagagctacacagagaaagcctatcttaggggaaaaaaaaagtcttctaagtctaataacatta
aaagaagtcttaagatcagcggttctccaccttcctaatgtattaaagggcttaactctttaacccttta
aaacagttcttcatgttgtgctgacccccaatcgtaaaataattctcattgttacttcaaaactttagtt
ttgctcctgttatgaattgtaatgtaaatatctgtgttttctgatggtcttaggcccctcctgtgaaagg
gttgtttgaccccaaagggtcaagacctacaggttgagaaccattgctttagatgtttttggagttttat
accagtgtgagagacctttgcggctggcatggagacaaaagcatacagtggcagagaacagacaggaagt
tggtgattggctgattttatatagggcagtttatcatggagtaaggtcttagataggcctcactccacct
gagtgaggtagacatcctatatctttattccatagataagtaatattaagtgggcttcctaaaggcgcat
aacgataccacgatatcaacaagtttgtacaaaaaagcaggctggcgccggaaccgaagttcctattccg
aagttcctattctctagaaagtataggaacttcgaacccttcccacaccaccctccacacttgccccaa
acactgccaactatgtaggaggaaggggttgggactaacagaagaacccgttgtggggaagctgttggga
gggtcactttatgttcttgcccaaggtcagttgggtggcctgcttctgatgaggtggtcccaaggtctgg
ggtagaaggtgagagggacaggccaccaaggtcagccccccccccctatcccataggagccaggtccctc
tcctggacaggaagactgaaggggagatgccagagactcagtgaagcctggggtaccctattggagtcct
tcaaggaaacaaacttggcctcaccaggcctcagccttggctcctcctgggaactctactgcccttggga
tccccttgtagttgtgggttacataggaaggggacgggattccccttgactggctagcctactcttttc
ttcagtcttctccatctcctctcacctgtctctcgacccttccctaggatagacttggaaaaagataag

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

gggagaaaacaaatgcaaacgaggccagaaagattttggctgggcattccttccgctagcttttattggg
atcccctagtttgtgataggccttttagctacatctgccaatccatctcattttcacacacacacacacc
actttccttctggtcagtgggcacatgtccagcctcaagtttatatcaccacccccaatgcccaacactt
gtatggccttgggcgggtcatccccccccccacccccagtatctgcaacctcaagctagcttgggtgcgt
tggttgtggataagtagctagactccagcaaccagtaacctctgccctttctcctccatgacaaccaggt
cccaggtcccgaaaaccaaagaagaagaaccctaacaaagaggacaagcggcctcgcacagccttcactg
ctgagcagctccagaggctcaaggctgagtttcagaccaacaggtacctgacagagcagcggcgccagag
tctggcacaggagctcggtacccggaagatctggactctagagaattccgcccctctccctcccccccc
ctaacgttactggccgaagccgcttggaataaggccggtgtgcgtttgtctatatgttattttccaccat
attgccgtcttttggcaatgtgagggcccggaaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggt
ctttcccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgttgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagctt
cttgaagacaaacaacgtctgtagcgacccctttgcaggcagcggaacccccacctggcgacaggtgcct
ctgcggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaaccccagtgccacgttgtgagt
tggatagttgtggaaagagtcaaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgcccaga
aggtaccccattgtatgggatctgatctggggcctcggtgcacatgctttacatgtgtttagtcgaggtt
aaaaaacgtctaggccccccgaaccacggggacgtggttttcctttgaaaaacacgatgataagcttgcc
acaaccatggaagatcccgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttacccaacttaatc
gccttgcagcacatccccctttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgcccttccca
acagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgctttgcctggtttccggcaccagaagcggtgccggaaagc
tggctggagtgcgatcttcctgaggccgatactgtcgtcgtcccctcaaactggcagatgcacggttacg
atgcgcccatctacaccaacgtgacctatcccattacggtcaatccgccgtttgttcccacggagaatcc
gacgggttgttactcgctcacatttaatgttgatgaaagctggctacaggaaggccagacgcgaattatt
tttgatggcgttaactcggcgtttcatctgtggtgcaacgggcgctgggtcggttacggccaggacagtc
gtttgccgtctgaatttgacctgagcgcatttttacgcgccggagaaaaccgcctcgcggtgatggtgct
gcgctggagtgacggcagttatctggaagatcaggatatgtggcggatgagcggcattttccgtgacgtc
tcgttgctgcataaaccgactacacaaatcagcgatttccatgttgccactcgctttaatgatgatttca
gccgcgctgtactggaggctgaagttcagatgtgcggcgagttgcgtgactacctacgggtaacagtttc
tttatggcagggtgaaacgcaggtcgccagcggcaccgcgcctttcggcggtgaaattatcgatgagcgt
ggtggttatgccgatcgcgtcacactacgtctgaacgtcgaaaacccgaaactgtggagcgccgaaatcc
cgaatctctatcgtgcggtggttgaactgcacaccgccgacggcacgctgattgaagcagaagcctgcga
tgtcggtttccgcgaggtgcggattgaaaatggtctgctgctgctgaacggcaagccgttgctgattcga
ggcgttaaccgtcacgagcatcatcctctgcatggtcaggtcatggatgagcagacgatggtgcaggata
tcctgctgatgaagcagaacaactttaacgccgtgcgctgttcgcattatccgaaccatccgctgtggta
cacgctgtgcgaccgctacggcctgtatgtggtggatgaagccaatattgaaacccacggcatggtgcca
atgaatcgtctgaccgatgatccgcgctggctaccggcgatgagcgaacgcgtaacgcgaatggtgcagc
gcgatcgtaatcacccgagtgtgatcatctggtcgctggggaatgaatcaggccacggcgctaatcacga
cgcgctgtatcgctggatcaaatctgtcgatccttcccgcccggtgcagtatgaaggcggcggagccgac
accacggccaccgatattatttgcccgatgtacgcgcgcgtggatgaagaccagcccttcccggctgtgc
cgaaatggtccatcaaaaaatggctttcgctacctggagagacgcgcccgctgatcctttgcgaatacgc
ccacgcgatgggtaacagtcttggcggtttcgctaaatactggcaggcgtttcgtcagtatccccgttta
cagggcggcttcgtctgggactgggtggatcagtcgctgattaaatatgatgaaaacggcaacccgtggt
cggcttacggcggtgattttggcgatacgccgaacgatcgccagttctgtatgaacggtctggtctttgc
cgaccgcacgccgcatccagcgctgacggaagcaaaacaccagcagcagtttttccagttccgtttatcc
gggcaaaccatcgaagtgaccagcgaatacctgttccgtcatagcgataacgagctcctgcactggatgg
tggcgctggatggtaagccgctggcaagcggtgaagtgcctctggatgtcgctccacaaggtaaacagtt
gattgaactgcctgaactaccgcagccggagagcgccgggcaactctggctcacagtacgcgtagtgcaa
ccgaacgcgaccgcatggtcagaagccgggcacatcagcgcctggcagcagtggcgtctggcggaaaacc
tcagtgtgacgctccccgccgcgtcccacgccatcccgcatctgaccaccagcgaaatggatttttgcat
cgagctgggtaataagcgttggcaatttaaccgccagtcaggctttctttcacagatgtggattggcgat
aaaaaacaactgctgacgccgctgcgcgatcagttcacccgtgcaccgctggataacgacattggcgtaa
gtgaagcgacccgcattgaccctaacgcctgggtcgaacgctggaaggcggcgggccattaccaggccga
agcagcgttgttgcagtgcacggcagatacacttgctgatgcggtgctgattacgaccgctcacgcgtgg
cagcatcaggggaaaaccttatttatcagccggaaaacctaccggattgatggtagtggtcaaatggcga
ttaccgttgatgttgaagtggcgagcgatacaccgcatccggcgcggattggcctgaactgccagctggc
gcaggtagcagagcgggtaaactggctcggattagggccgcaagaaaactatcccgaccgccttactgcc
gcctgttttgaccgctgggatctgccattgtcagacatgtataccccgtacgtcttcccgagcgaaaacg
gtctgcgctgcgggacgcgcgaattgaattatggcccacaccagtggcgcggcgacttccagttcaacat
cagccgctacagtcaacagcaactgatggaaaccagccatcgccatctgctgcacgcggaagaaggcaca
tggctgaatatcgacggtttccatatggggattggtggcgacgactcctggagcccgtcagtatcggcgg
aattccagctgagcgccggtcgctaccattaccagttggtctggtgtcaaaaataataataaccgggcag
gggggatctaagctctagataagtaatgatcataatcagccatatcacatctgtagaggttttacttgct

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

ttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgttgttgttaacttgt
ttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttc
actgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggatccggaataacttc
gtatagcatacattatacgaagttatgtttaaacggcgcgccccggaattcgccttctgcaggagcgtac
agaacccagggccctggcacccgtgcagaccctggcccaccccacctgggcgctcagtgcccaagagatg
tccacacctaggatgtcccgcggtgggtgggggggcccgagagacgggcaggccgggggcaggcctggcca
tgcggggccgaaccgggcactgcccagcgtgggcgcgggggccacggcgcgcgcccccagcccccgggcc
cagcaccccaaggcggccaacgccaaaactctccctcctcctcttcctcaatctcgctctcgctcttttt
ttttttcgcaaaaggaggggagaggggtaaaaaaatgctgcactgtgcggcgaagccggtgagtgagcg
gcgcggggccaatcagcgtgcgccgttccgaaagttgccttttatggctcgagcggccgcggcggcgccc
tataaaacccagcggcgcgacgcgccaccaccgccgagaccgcgtccgccccgcgagcacagagcctcgc
ctttgccgatcctctagagtcgagatccgccgccaccatgattgaacaagatggattgcacgcaggttct
ccggccgcttgggtggagaggctattcggctatgactgggcacaacagacaatcggctgctctgatgccg
ccgtgttccggctgtcagcgcaggggcgcccggttctttttgtcaagaccgacctgtccggtgccctgaa
tgaactgcaggacgaggcagcgcggctatcgtggctggccacgacgggcgttccttgcgcagctgtgctc
gacgttgtcactgaagcgggaagggactggctgctattgggcgaagtgccggggcaggatctcctgtcat
ctcaccttgctcctgccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatgcggcggctgcatacgcttgatcc
ggctacctgcccattcgaccaccaagcgaaacatcgcatcgagcgagcacgtactcggatggaagccggt
cttgtcgatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgccagccgaactgttcgccaggctca
aggcgcgcatgcccgacggcgaggatctcgtcgtgacccatggcgatgcctgcttgccgaatatcatggt
ggaaaatggccgcttttctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggaccgctatcaggacata
gcgttggctacccgtgatattgctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttcctcgtgctttacg
gtatcgccgctcccgattcgcagcgcatcgccttctatcgccttcttgacgagttcttctgagcgggact
ctggggttcgaaatgaccgaccaagcgacgcccaacctgccatcacgagatttcgattccaccgccgcct
tctatgaaaggttgggcttcggaatcgttttccgggacgccggctggatgatcctccagcgcggggatct
catgctggagttcttcgcccaccccccggatctaagctctagataagtaatgatcataatcagccatatc
acatctgtagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaacataaaatga
atgcaattgttgttgttaacttgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaaa
tttcacaaataaagcatttttttcactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttat
catgtctggatccgggggtaccgcgtcgagaagttcctattccgaagttcctattctctagaaagtatag
gaacttcgtcgagataacttcgtatagcatacattatacgaagttatgtcgagatatctagacccagctt
tcttgtacaaagtggttgatatctctatagtcgcagtaggcggttagtttctaactcactgcagacgcag
aatgtgggaacagtcagacggatgctgtgtttccatctcgtccccatcctcacgggaaacacaaagacac
acaccattgctggatgcactctgtttccagtgtttgccggacatcagtacgtgcaatgatttaggaggtg
gctcgaaataaaggactgaaaagttcagagttccttttaaaagagactagagagtcagattggcaacctc
tcgcactggggtggaagttaggatcacagaacctgccagatggttcaaagaggaggcctaggatgacagc
ccatgacaggtccgtgttccaggaggaggaggaggaggaggaggagggagcatcctcaggcttctgcctt
cccgtctctttccccccaaacagtgacgcctcacacagcggcatgctgcctcgacttggtgacctgctttt
ctacactattgcagagggacaggagcgtatccctatccacaagttcaccac

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Bibliografía

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Adams, M., Mueller, H. & Froehner, S. (2001). In vivo requirement of the α-syntrophin PDZ domain for the sarcolemmal localization of nNOS and aquaporin-4. *J Cell Biol*, 155(1), pp.113-122.

Agostini, M., Romeo, F., Inoue, S., Niklison-Chirou, M., Elia, A., Dinsdale, D., Morone, N., Knight, R., Mak, T. & Melino, G. (2016). Metabolic reprogramming during neuronal differentiation. *Cell Death Differ*.

Ahn, A.H., Freener, C.A., Gussoni, E., Yoshida, M., Ozawa, E. & Kunkel, L.M. (1996). The Three Human Syntrophin Genes Are Expressed in Diverse Tissues, Have Distinct Chromosomal Locations, and Each Bind to Dystrophin and Its Relatives. *J. Biol. Chem.* Vol. 271 (5), pp. 2724–2730.

Aledo, J., de Pedro, E., Gómez-Fabre, P., Núñez de Castro, I. & Márquez, J. (1997). Submitochondrial localization and membrane topography of Ehrlich ascitic tumour cell glutaminase. *BBA. Biomembranes*, 1323(2), pp.173-184.

Aledo, J.C., Gómez-Fabre, P.M., Olala, L. & Márquez, J. (2000). Identification of two human glutaminase loci and tissue-specific expression of the two related genes. *Mamm. Genome* Vol.11 (12), pp. 1107-1110.

Aledo, J.C., Segura, J.A., Medina, M.A., Alonso, F.J., Núñez de Castro, I. & Márquez, J. (1995). Phosphate-activated glutaminase expression during tumor development. *FEBS*. 341, pp. 39-42.

Álvarez-Buylla, A. & Lim, D.A. (2004). Fort the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron.* 41 (5), pp.683-686.

Aoki, J., Inoue, A. & Okudaira, S. (2008). Two pathways for lysophosphatidic acid production. *BBA-Mol. Cell. Biol. L.* 1781, pp. 513-518.

Arama, J., Boulay, A., Bosc, C., Delphin, C., Loew, D., Rostaing, P., Amigou, E., Ezan, P., Wingertsmann, L., Guillaud, L., Andrieux, A., Giaume, C. & Cohen-Salmon, M. (2012).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Bmcc1s, a Novel Brain-Isoform of Bmcc1, Affects Cell Morphology by Regulating MAP6/STOP Functions. *PLoS ONE*, 7(4), p.e35488.

Attwell, D., Buchan, A.M., Charpak, S., Lauritzen, M., MacVicar, B.A. & Newman, E.A. (2010). Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* 11, 46, pp. 232–243.

Attwell, D. & Laughlin, S. (2001). An Energy Budget for Signaling in the Grey Matter of the Brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, pp.1133-1145.

Austin, J.C, Chacko, S.K, DiSanto, M., Canning, D.A. & Zderic, S.*A.* (2004). A male murine model of partial bladder outlet obstruction reveals changes in detrusor morphology, contractility and Myosin isoform expression. *J Urol.* 172, pp. 1524-1528.

Austin, S., Ziese, M. & Sternberg, N. (1981). A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell* 25(3), pp. 729-36.

Baglietto-Vargas, D., López-Téllez, J.F., Moreno-González, I., Gutiérrez, A. & Aledo, J.C. (2004). Segregation of two glutaminase isoforms in inslets of Langerhans. *Biochem. J.* 381, pp. 483-487.

Balak, K.J., Keith, R.H. & Felder, M.R. (1982). Genetic and developmental regulation of mouse liver alcohol dehydrogenase. *JBC.* 257 (24), pp. 15000-15007.

Bektas, M., Payne, S.G., Liu, H., Goparaju, S., Milstien, S. & Spiegel, S. (2005). A novel acylglycerol kinase that produces lysophosphatidic acid modulates cross talk with EGFR in prostate cancer cells. *J. Cell. Biol* 169, pp. 801-811.

Benavides, F. J., & Guénet, J-L. (2003). *Manual de genética de roedores de laboratorio. Capítulo VIII.* Madrid: Universidad de Alcalá de Henares.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Berl, S. & Clarke, D.D. (1983). The metabolic compartmentation concept. In glutamine, glutamate and GABA in the CNS. Hertz L., Kvamme, E., McGeer, E.G., Schousboe, A. Editors. New York, Alan R.Liss; pp. 205-217.

Bernelot-Moens, C., Auerbach, A.B., Conlon, R.A., Joyner, A.L. & Rossant, J. (1992). A targeted mutation reveals a role for N-myc in branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. *Genes Dev.* 6(5), pp.691-704.

Bilousova, T., Dansie, L., Ngo, M., Aye, J., Charles, J., Ethell, D. & Ethell, I. (2008). Minocycline promotes dendritic spine maturation and improves behavioural performance in the fragile X mouse model. *J. Med. Genet.* 46(2), pp.94-102.

Blanco [2] E., Bilbao, A., Luque-Rojas, M.J., Palomino, A., Bermúdez-Silva, F.J., Suárez, J., Santín, L.J., Estivill-Torrús, G. Gutiérrez, A., Campos-Sandoval, J.A., Alonso-Carrión, F.J., Márquez, J. & Rodríguez de Fonseca, F. (2012). Attenuation of cocaine-induced conditioned locomotion is associated with altered expression of hippocampal glutamate receptors in mice lacking LPA1 receptors. *Psychopharmacology*. Volume 220, Issue 1, pp. 27-42.

Blanco[1] , E., Campos-Sandoval, J.A., Palomino, A., Luque-Rojas, M.J., Bilbao, A., Suárez, J., Márquez, J. & Rodríguez de Fonseca, F. (2012). Cocaine modulates both glutaminase gene expression and glutaminase activity in the brain of cocaine-sensitized mice. *Psychopharmacology*, 219, pp. 933-944.

Bomar, J. M., Benke, P. J., Slattery, E. L., Puttagunta, R., Taylor, L. P., Seong, E., Nystuen, A., Chen, W., Albin, R. L. & Patel, P. D. (2003). Mutations in a novel gene encoding a CRAL-TRIO domain cause human Cayman ataxia and ataxia/dystonia in the jittery mouse. *Nat. Genet.* 35, pp. 264-269.

Bouabe, H. & Okkenhaug, K. (2013). Gene Targeting in Mice: a Review. *Methods Mol Biol*. 1064, pp. 315–336.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Boulay, A., Burbassi, S., Lorenzo, H., Loew, D., Ezan, P., Giaume, C. & Cohen-Salmon, M. (2013). Bmcc1s interacts with the phosphate-activated glutaminase in the brain. *Biochimie*, 95(4), pp.799-807.

Brinster, R. & Tenbroeck, J. (1969). Blastocyst development of mouse pre-implantation embryos in the rabbit fallopian tube. *Reproduction*, 19(3), pp.417-421.

Buchholz, F., Angrand, P.O. & Stewart, A.F. (1998) Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat. Biotechnol.* 16(7), pp. 657-62.

Buschdorf, J.P., Li Chew, L., Zhang, B., Cao, Q., Liang, F.Y., Liou, Y.C., Zhou, Y.T. & Low, B.C. (2006). Brain-specific BNIP-2-homology protein Caytaxin relocalises glutaminase to neurite terminals and reduces glutamate levels. *J. Cell Sci.* 119, pp. 3337-3350.

Campos, J., Aledo, J., Segura, J., Alonso, F., Gómez-Fabre, P., Núñez de Castro, I. & Márquez, J. (2003). Expression of recombinant human l-glutaminase in Escherichia coli: polyclonal antibodies production and immunological analysis of mouse tissues. *BBA-Proteins Proteom.* 1648(1-2), pp.17-23.

Campos-Sandoval, J.A., López de la Oliva, A.R., Lobo, C., Segura J.A., Matés, J.M., Alonso, F.J. & Márquez, J. (2007) Expression of functional human glutaminase in baculovirus system: affinity purification, kinetic and molecular characterization. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (4), pp. 765-73.

Campos-Sandoval, J.A., Martín-Rufián, M., Cardona, C. Lobo, C., Peñalver, A. & Márquez, J. (2015). Glutaminases in brain: multiple isoforms for many purposes. *Neurochem. Int.* 88, pp. 1-5.

Capecchi, M.R. (1994). Targeted Gene Replacement. *Sci. Am*. 270, pp. 52–59.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Cardona, C., Sánchez-Mejías, E., Dávila, J.C., Martín-Rufián, M., Campos-Sandoval, J.A., Vitorica, J., Alonso, F.J., Matés, J.M., Segura, J.A., Norenberg, M.D., Rama Rao, K.V., Jayakumar, A.R., Gutiérrez, A. & Márquez, J. (2015). Expression of Gls and Gls2 glutaminase isoforms in astrocytes. *Glia*, Vol.63, 3, pp. 365-382.

Cassago, A., Ferreira, A., Ferreira, I., Fornezari, C., Gomes, E., Greene, K., Pereira, H., Garratt, R., Dias, S. & Ambrosio, A. (2012). Mitochondrial localization and structure-based phosphate activation mechanism of Glutaminase C with implications for cancer metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.*USA109(4), pp.1092-1097.

Castell, L., Vance, C., Abbott, R., Márquez, J. & Eggleton, P. (2004). Granule Localization of Glutaminase in Human Neutrophils and the Consequence of Glutamine Utilization for Neutrophil Activity. *J. Biol. Chem.* 279, pp. 13305-13310.

Chatot, C., Lawry, J., Germain, B. & Ziomek, C. (1997). Analysis of glutaminase activity and RNA expression in preimplantation mouse embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 47(3), pp.248-254.

Chea, S.S. & Behringer, R.R. (2001). Contemporary gene targeting strategies for the novice. *Mol. Biotechnol.,* Vol. 19 (3), pp. 297-304.

Chiu, J. F. & Boeker, E. A. (1979). Cow brain glutaminase: partial purification and mechanism of action. *Arch. Biochem. Biophys.* 196, pp. 493-500.

Cho, K.O, Hunt, C.A, Kennedy, M.B. (1992). The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *Neuron* 9, pp. 929–942.

Choi, J. & Chun, J. (2013). Lysophospholipids and their receptors in the central nervous system. *BBA-Mol. Cell. Biol. L.* 1831(1), pp.20-32.

Choi, J.W., Herr, D., Noguchi, K., Yung, Y., Lee, C-W., Mutoh, T., Lin, M-E., Teo, S.T., Park, K .E., Mosley, A.N. & Chun, J. (2010). LPA Receptors: Subtypes and Biological Actions. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 50, pp. 157–86.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Chun, J., Hla, T., Spiegel, S. Moolenaar, W. (2013). Lysophospholipid Receptors: Signaling and Biochemistry. Hoboken, New Jersey. John Wiley & Sons, Inc.

Coleman, J., Brennan, K., Ngo, T., Balaji, P., Graham, R. & Smith, N. (2015). Rapid Knockout and Reporter Mouse Line Generation and Breeding Colony Establishment Using EUCOMM Conditional-Ready Embryonic Stem Cells: A Case Study. *Front. Endocrinol.* 6.

Coleman, D. & Kuzava, J.E. (1991). Genetic regulation of malic enzyme activity in the mouse. *JBC*, 266 (32), pp.21997-22002.

Conti, F. & Weinberg, R.J. (1999). Shaping excitation at glutamatergic synapses. *Trends Neurosci.* 22, pp. 451-8.

Contos, J.A. & Chun, J. (1998). Complete cDNA sequence, genomic structure, and chromosomal localization of the LPA receptor gene, lpA1/vzg-1/Gpcr26. *Genomics* 51, pp. 364–78.

Contos, J.A**,** Fukushima, N., Weiner, J.A., Kaushal, D. & Chun, J. (2000). Requirement for the lpA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 97; 24, pp. 13384–13389.

Curthoys, N.P., Kuhlenschmidt, T., Godfrey, S.S. & Weiss, R.F. (1976). Phosphate – dependent glutaminase from rat kidney. Cause of increased activity in response to acidosis and identity with glutaminase from other tissues. *Arch.Biochem.Biophys.* 172, pp. 162-167.

Curthoys, N. P. & Watford, M. (1995). Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 15, pp. 133–159.

Curthoys, N.P. & Weiss, R.F. (1974). Regulation of Renal Ammoniagenesis: Subcellular localization of rat kidney glutaminase isoenzymes. *JBC.* Vol. 249, (10), pp. 3261-3266.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Dager, A.D., McKay, D.R., Kent Jr, J.W., Curran, J.E., Knowles, E., Sprooten, E., Göring, H.H., Dyer, T.D., Pearlson, G.D., Olvera, R.L., Fox5, P.T., Lovallo, W.R., Duggirala, R., Almasy, L., Blangero, J. & Glahn, D.C. (2015). Shared Genetic Factors Influence Amygdala Volumes and Risk for Alcoholism. *Neuropsycopharmacology* 40, pp. 412-420.

Di Chiara, G. & Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 85 (14), pp.5274-5278.

Dymecki, S.M. (1996). Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 93, pp. 6191-6196.

Dziembowska, M., Pretto, D., Janusz, A., Kaczmarek, L., Leigh, M., Gabriel, N., Durbin-Johnson, B., Hagerman, R. & Tassone, F. (2013). High MMP-9 activity levels in fragile X syndrome are lowered by minocycline. *Am. J. Med. Genet.*, 161(8), pp.1897-1903.

Dziembowska, M. & Wlodarczyk, J. (2012). MMP9: A novel function in synaptic plasticity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44(5), pp. 709-713.

Ebrahimi, S. & Okabe S. (2014). Structural dynamics of dendritic spines: molecular composition, geometry and functional regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, pp. 2391-2398.

Elgadi, K.M., Meguid, R.A., Quian, M, Souba, W.W. & Abcouwer, S.F. (1999). Cloning and analysis of unique human glutaminase isoforms generated by tissue-specific alternative splicing. *Physiol. Genomics* 1 (2), pp. 51-62.

Erecinska, M. & Silver, I.A. (1990). Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 35, pp. 245-96.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Estivill-Torrús, G., Llebrez-Zayas, P., Matas-Rico, E., Santín, L., Pedraza, C., De Diego, I., Del Arco, I., Fernández-Llebrez, P., Chun, J. & Rodríguez De Fonseca, F. (2008). Absence of LPA1 Signaling Results in Defective Cortical Development. *Cereb. Cortex* 18, pp. 938-950.

Evans, M.J. & Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, pp. 154-156.

Fiering, S., Epner, E., Robinson, K., Zhuang, Y., Telling, A., Hu, M., Martin, D., Enver, T., Ley, T. & Groudine, M. (1995). Targeted deletion of 5'HS2 of the murine beta-globin LCR reveals that it is not essential for proper regulation of the beta-globin locus. *Genes Dev.*, 9 (18), pp.2203-2213.

Fonnum, F. (1984). Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* 42, pp. 1-11.

Frigeri, A., Nicchia, G.P., Verbavatz, J.M., Valenti, G. & Svelto, M. (1998). Expression of aquaporin-4 in fast twitch fibers of mammalian skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 102, pp. 695–703.

Fukushima, N., Ishii, I., Contos, J. J., Weiner, J.A. & Chun, J. (2001). Lysophospholipid receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, pp. 507-534.

Fukushima, N., Shano, S., Moriyama, R. & Chun, J. (2007). Lysophosphatidic acid stimulates neuronal differentiation of cortical neuroblasts through the LPA1–Gi/o pathway. *Neurochem. Int.* 50(2), pp.302-307.

Gee, S.H., Madhavan, R., Levinson, S.R., Caldwell, J.H., Sealock, R. & Froehner, S.C. Interaction of Muscle and Brain Sodium Channels with Multiple Members of the Syntrophin Family of Dystrophin-Associated Proteins. (1998). *J. Neurosci.* 18 (1), pp. 128–137.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Gerrard, J. M. & Robinson, P. (1989). Identification of the molecular species of lysophosphatidic acid produced when platelets are stimulated by thrombin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1001:282.

Godfrey, S.S., Kuhlenschmidt, S. & Curthoys, N. P. (1977). Correlation between activation and dimer formation of rat renal phosphate-dependent glutaminase. *J. Biol. Chem.* 252, pp. 1927-1931.

Goldstein, L. (1966) Relation of glutamate to ammonia production in the rat kidney. *Am. J. Physiol.* 210, pp. 661-666.

Gómez-Fabre, P., Aledo, J.C., Del Castillo-Olivares, A., Alonso, F.J., Núñez de Castro, I., Campos-Sandoval, J.A. & Márquez, J. (2000). Molecular cloning, sequencing and expression studies of the human breast cancer cell glutaminase. *Biochem. J.* 345(2), pp. 365-375.

Gordon, J.W. (1997). Transgenic Technology and Laboratory Animal Science. *ILAR J.* 38, 1, pp. 32-41.

Gordon, J., Scangos, G., Plotkin, D., Barbosa, J. & Ruddle, F. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 77(12), pp.7380-7384.

Gossler, A., Doetschman, T., Korn, R., Serfling, E. & Kemler, R. (1986). Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 83(23), pp.9065-9069.

Haldar, D. & Vancura, A. (1992). Glycerophosphate acyltransferase from liver. *Meth. Enzymol* 209:64.

Hall, B., Limaye, A. & Kulkarni, A.B. 2009. Overview: Generation of Gene Knockout Mice. *Curr. Protoc. Cell Biol.* Chapter 19, Unit 19, pp. 1-17.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Harrison, S.M., Reavill, C., Brown, G., Brown, J.T., Cluderay, J.E., Crook, B., Davies, C.H., Dawson, L.A., Grau, E., Heidbreder, P., Hemmati, G., Hervieu, A., Howarth, A., Hughees, Z.A., Hunter, A.J., Latchman, J., Pickering, S., Pugh, P., Rogers, D.C., Shilliam, C.S. & Maycox, P.R. (2003). LPA1 receptor-deficient mice have phenotypic changes observed in psychiatric disease. *Mol. Cell. Neurosci.*. 24(4), pp. 1170-9.

Haser, W.G., Shapiro, R.A. & Curthoys, N.P. (1985). Comparison of phosphate-dependent glutaminase obtained from rat brain and kidney. *Biochem. J.* 229, pp. 399-408.

Häussinger, D., Lamers, W.H. & Moorman, A.F. (1992). Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of amino acids and ammonia. *Enzyme*, 46 (1-3), pp.72-93.

Hawkins, R. (2009). The blood-brain barrier and glutamate. *Am. J.Clin. Nutr.*, 90(3), pp. 867S-874S.

Hayashi-Takagi, A., Takaki, M., Graziane, N., Seshadri, S., Murdoch, H., Dunlop, A., Makino, Y., Seshadri, A., Ishizuka, K., Srivastava, D., Xie, Z., Baraban, J., Houslay, M., Tomoda, T., Brandon, N., Kamiya, A., Yan, Z., Penzes, P. & Sawa, A. (2010). Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) regulates spines of the glutamate synapse via Rac1. *Nature Neurosci.*, 13(3), pp.327-332.

Hecht, J.H., Weiner, J.A., Post, S.R. & Chun, J. (1996). Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *J. Cell. Biol.* 135, pp. 1071–83.

Hertz, L. (1979) Functional interactions between neurons and astrocytes. I. Turnover and metabolism of putative amino acid transmitters. *Prog. Neurobiol.* 13, pp. 277-323.

Hirano, T., Ishihara, K. & Hibi, M. (2000). Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* 19, pp. 2548-2556.

Houdebini, L.M. (2002). The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression. *J. Biotechnol.* 98, pp. 145–160.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Hotulainen, P. & Hoogenraad, C. (2010). Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J.Exp.Med.* 207(6), pp.619-628.

Hu, W., Zhang, C., Wu, R., Sun, Y., Levine, A. & Feng, Z. (2010). Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 107(16), pp. 7455-7460.

Huang, J., Deng, K., Wu, H., Liu, Z., Chen, Z., Cao, S., Zhou, L., Ye, X., Keefe, D. & Liu, L. (2008). Efficient Production of Mice from Embryonic Stem Cells Injected into Four- or Eight-Cell Embryos by Piezo Micromanipulation. *Stem Cells*, 26(7), pp.1883-1890.

Huang, Y. Z. & Knox, W. E. (1976). A comparative study of glutaminase enzymes in rat tissues. *Enzyme* 21, pp. 408- 426.

Humphrey, S.E. & Kasinski, A.L. (2015) Rna-guided CRISPR-Cas technologies for genome-scale investigation of disease processes. *Am. J. Hematol.Oncol.* 8:31

Inoue, M., Wakayama, Y., Liu, J., Murahashi, M., Shibuya, S. & Oniki, H. (2002). Ultrastructural Localization of Aquaporin-4 and ALPHA.1-Syntrophin in the Vascular Feet of Brain Astrocytes. *Tohoku J. Exp. Med.*, 197(2), pp.87-93.

Jacobson, R.D., Virág, I. & Pate Skene, J.H. (1986). A protein associated with axon growth, GAP-43, is widely distributed and developmentally regulated in rat CNS. *J. Neurosci.* 6 (6), pp. 1843-1855.

Jaenisch, R. & Mintz, B. (1974). Simian Virus 40 DNA Sequences in DNA of Healthy Adult Mice Derived from Preimplantation Blastocysts Injected with Viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 71(4), pp.1250-1254.

Kalivas, P. (2004). Glutamate systems in cocaine addiction. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 4(1), pp. 23-29.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Kalivas, P.W. (2009). The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nat.Rev.Neurosci.* 10, pp. 561-572.

Kalra, J. & Brosnan, J. (1974). Localization of Phosphate-Independent Glutaminase in the Brush Border of Rat Kidney Cortex. *Can. J. Biochem.Cell B.* 52(9), pp.762-766.

Kim, E. & Sheng, M. (2004). PDZ domain proteins of synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* (10), pp. 771-81.

Kovacevic, Z. & McGivan, J.D. (1983). Mitochondrial metabolism of glutamine and glutamate and its physiological significance. *Physiol. Rev.* 63 (2) pp. 547-605.

Krebs, H.A. (1935). Metabolism of amino-acids. The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. *Biochem. J.* 29, pp. 1951-1969.

Kvamme, E. & Olsen, B. (1979). Evidence for two species of mammalian phosphate-activated glutaminase having different regulatory properties. *FEBS Lett.* 107(1), pp.33-36.

Kwan, K-M. (2002). Review Article. Conditional alleles in mice: Practical considerations for tissue-specific knockouts. *Genesis* 32, pp. 49-62.

Labow, B.I., Souba, W.W. (2000) Glutamine. *World J. Surg.* 24, 1503–1513.

Lacey, J. & Wilmore, D. (2009). Is Glutamine a Conditionally Essential Amino Acid?. *Nut. Rev.* 48(8), pp.297-309.

Lanner, F. & Rossant, J. (2010). Review The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells. *Development* 137, pp. 3351-3360.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Li, R., Tan, J., Chen, L., Feng, J., Liang, W., Guo, X., Liu, P., Chen, Z., Sha, J., Wang, Y. & Chen, S. (2014). Iqcg Is Essential for Sperm Flagellum Formation in Mice. *PLoS ONE*, 9(5), p.e98053.

Lin, M-E., Herr, D.R. & Chun, J. (2010). Lysophosphatidic acid (LPA) receptors: Signaling properties and disease relevance. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 91, pp. 130–138.

Liu, C. (2013). Strategies for designing transgenic DNA constructs. *Methods Mol. Biol*. 1027, pp. 183-201.

Low[1], B. C., Seow, K. T. & Guy, G. R. (2000). Evidence for a novel Cdc42GAP domain at the carboxyl terminus of BNIP-2. *J. Biol. Chem.* 275, pp. 14415-14422.

Low[2], B. C., Seow, K. T. & Guy, G. R. (2000). The BNIP-2 and Cdc42GAP homology domain of BNIP-2 mediates its homophilic association and heterophilic interaction with Cdc42GAP. *J. Biol. Chem.* 275, pp. 37742-37751.

Lüscher, C. (2015). The Emergence of a Circuit Model for Addiction. *Annu. Rev. Neurosci.* 39(1).

Lüscher, C. (2013). Drug-evoked synaptic plasticity causing addictive behavior. *J. Neurosci.* 33, pp. 17641-17646.

Lüthi, A. & Lüscher, C. (2014). Pathological circuit function underlying addiction and anxiety disorders. *Nat. Neurosci.* 17, pp. 1635-1643.

Ma, L., Reis, G., Parada, L.F. & Schuman, E.M. (1999). Neuronal NT-3 is not required for synaptic transmission or long-term potentiation in área CA1 of the adult rat hippocampus. *Learn. Memory* 6, pp. 267-275.

Makide, K., Kitamura, H., Sato, Y., Okutani, M. & Aoki, J. (2009). Emerging lysophospholipid mediators, lysophosphatidylserine, lysophosphatidylthreonine, lysophosphatidylethanolamine and lysophosphatidylglycerol. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 89, pp. 135-139.

Malarkey, E. & Parpura, V. (2008). Mechanisms of glutamate release from

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

astrocytes. *Neurochem. Inter.* 52(1-2), pp.142-154.

Markwell, M., Haas, S., Bieber, L. & Tolbert, N. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87(1), pp.206-210.

Márquez, J., Cardona, C., Campos-Sandoval, J.A., Peñalver, A., Tosina, M., Matés, J.M. & Martín-Rufián, M. (2013). Mammalian glutaminase isozymes in brain. *Metab. Brain Dis.* 28, pp.133-137.

Márquez, J., López de la Oliva, A.R., Matés, J.M., Segura, J.A.& Alonso, F.J. (2006). Glutaminase: a multifaceted protein not only involved in generating glutamate. *Neurochem. Int.* 48 (6-7), pp. 465-71.

Márquez, J., Matés, J.M., Campos-Sandoval, J.A. The Glutamate/GABA/Glutamine Cycle: Amino Acid Neurotransmitter Homeostasis. Sonnewald, Ursula & Schousboe, Arne (Eds.), Springer Verlag, Viena (en prensa).

Márquez, J., Tosina, M., de la Rosa, V., Segura, J.A., Alonso, F.J., Matés, J.M., Campos-Sandoval, J.A. (2009). New insights into brain glutaminases: Beyond their role on glutamatergic transmission. *Neurochem. Int.* 55, (1-3), pp. 64–70.

Martín-Rufián, M., Tosina, M., Campos-Sandoval, J.A. Manzanares, E., Lobo, C., Segura, J.A., Alonso, F.J., Matés, J.M. & Márquez, J. (2012). Mammalian Glutaminase Gls2 Gene Encodes Two Functional Alternative Transcripts by a Surrogate Promoter Usage Mechanism. *PLoS ONE* 7 (6)

Martínez-Hernández, A., Bell, K.P. & Norenberg, M.D. (1977). Glutamine synthetase: glial localization in brain**.** *Science* 195, 4284, pp. 1356-1358.

Mash, D., ffrench-Mullen, J., Adi, N., Qin, Y., Buck, A. & Pablo, J. (2007). Gene Expression in Human Hippocampus from Cocaine Abusers Identifies Genes which Regulate Extracellular Matrix Remodeling. *PLoS ONE*, 2(11), p.e1187.

Masson, J., Darmon, M., Conjard, A., Chuhma, N., Ropert, N., Thoby-Brisson, M., Foutz, A.S., Parrot, S., Miller, G., Jorisch, R., Polan, J., Hamon, M., Hen, R. & Rayport, S. (2006). Mice lacking brain/kidney phosphate-activated glutaminase have impaired

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

glutamatergic synaptic transmission, altered breathing, disorganized goal-directed behavior and die shortly after birth. *J. Neurosci.* 26(17) pp. 4660-4671.

Mataga, N., Mizuguchi, Y. & Hensch, T. (2004). Experience-Dependent Pruning of Dendritic Spines in Visual Cortex by Tissue Plasminogen Activator. *Neuron*, 44(6), pp.1031-1041.

Matas-Rico, E., García-Diaz, B., Llebrez-Zayas, P., López-Barroso, D., Santín, L., Pedraza, C., Smith-Fernández, A., Fernández-Llebrez, P., Tellez, T., Redondo, M., Chun, J., Rodríguez de Fonseca, F. & Estivill-Torrús, G. (2008). Deletion of lysophosphatidic acid receptor LPA1 reduces neurogenesis in the mouse dentate gyrus. *Mol. Cell. Neurosci..* 39(3), pp. 342-55.

Matés, J., Segura, J., Campos-Sandoval, J., Lobo, C., Alonso, L., Alonso, F. & Márquez, J. (2009). Glutamine homeostasis and mitochondrial dynamics. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41(10), pp.2051-2061.

McKinney, R. (2010). Excitatory amino acid involvement in dendritic spine formation, maintenance and remodelling. *J. Physiol.* 588(1), pp.107-116.

Meertens, L., Miyata, K., Cechetto, J., Rachubinski, R. & Capone, J. (1998). A mitochondrial ketogenic enzyme regulates its gene expression by association with the nuclear hormone receptor PPARα. *EMBO. J*, 17(23), pp.6972-6978.

Meighan, S., Meighan, P., Choudhury, P., Davis, C., Olson, M., Zornes, P., Wright, J. & Harding, J. (2006). Effects of extracellular matrix-degrading proteases matrix metalloproteinases 3 and 9 on spatial learning and synaptic plasticity. *J. Neurochem*. 96(5), pp.1227-1241.

Melton, D.W. (2002). Gene-targeting strategies. *Methods Mol. Biol.* 180, pp. 151–73.

Michaluk, P., Wawrzyniak, M., Alot, P., Szczot, M., Wyrembek, P., Mercik, K., Medvedev, N., Wilczek, E., De Roo, M., Zuschratter, W., Muller, D., Wilczynski, G.M., Mozrzymas, J.W., Stewart, M.G., Kaczmarek, L. & Wlodarczyk1, J. (2011). Influence of matrix metalloproteinase MMP-9 on dendritic spine morphology. *J. Cell Sci.* 124, pp. 3369-3380.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Mohn, A.R., Yao, W-D. & Caron, M.G. (2004). Genetic and genomic approaches to reward and addiction. *Neuropharmacology* 47 (Suppl 1), pp. 101-110.

Möller, T., Contos, J., Musante, D., Chun, J. & Ransom, B. (2001). Expression and Function of Lysophosphatidic Acid Receptors in Cultured Rodent Microglial Cells. *JBC.* 276(28), pp.25946-25952.

Nagy, A. (2000). Review Article. Cre recombinase: The Universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26, pp. 99-109.

Nagy, V., Bozdagi, O., Matynia, A., Balcerzyk, M., Okulski, P., Dzwonek, J., Costa, R.M., Silva, A.J., Kaczmarek, L. & Huntley, G.W. (2006). Matrix Metalloproteinase-9 Is Required for Hippocampal Late-Phase Long-Term Potentiation and Memory. *The J. Neurosci.* 7, pp. 1923–1934.

Nagy, A. & Vintersten, K. (2006). Murine embryonic stem cells. *Methods Enzymol.* 418, pp. 3-21.

Nicklas, W., Zeevalk, G. & Hyndman, A. (1987). Interactions between neurons and glia in glutamate/glutamine compartmentation. *Biochm. Soc. Trans.*, 15(2), pp.208-210.

Ohuchi, H., Hamada, A., Matsuda, H., Takagi, A., Tanaka, M., Aoki, J., Arai, H. & Noji, S. (2008). Expression patterns of the lysophospholipid receptor genes during mouse early development. *Dev. Dyn.* 237, pp. 3280–94.

Olalla, L., Aledo, J. C., Bannenberg, G. & Márquez, J. (2001). The C-terminus of human glutaminase L mediates association with PDZ domain-containing proteins *FEBS. Lett.* 488**,** pp**.** 116–122.

Olalla, L., Gutiérrez, A., Campos-Sandoval, J.A, Khan, Z.U., Alonso, F.J., Segura, J.A., Márquez, J. & Aledo, J.C. (2002). Nuclear Localization of L-type Glutaminase in Mammalian Brain. *JBC*. 277 (41) pp. 38939–38944.

Olalla, L., Gutiérrez, A., Jiménez, A.J., López-Téllez, J.F., Khan, Z.U., Pérez, J., Alonso, F.J., de la Rosa, V., Campos-Sandoval, J.A., Segura, J.A., Aledo, J.C. & Márquez, J.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

(2008). Expression of the scaffolding PDZ protein glutaminase-interacting protein in mammalian brain. *J.Neurosci. Res.* 86, pp. 281-292.

Pages, C., Simon, M.F., Valet, P. & Saulnier- Blache, J.S. (2001). Lysophosphatidic acid synthesis and reléase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 64 (1-4), pp. 1-10.

Palaiologos, G., Hertz, L. & Schousboe, A. (1988). Evidence that Aspartate Aminotransferase Activity and Ketodicarboxylate Carrier Function Are Essential for Biosynthesis of Transmitter Glutamate. *J. Neurochem.* 51 (1), pp. 317-320.

Palmer, T.D., Willhoite, A.R. & Gage, F.H. (2000). Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J. Comp. Neurol*. 425, pp. 479–494.

Palomino, A., Pavón, F., Blanco-Calvo, E., Serrano, A., Arrabal, S., Rivera, P., Alén, F., Vargas, A., Bilbao, A., Rubio, L., Rodríguez de Fonseca, F. & Suárez, J. (2014). Effects of acute versus repeated cocaine exposure on the expression of endocannabinoid signaling-related proteins in the mouse cerebellum. *Front. Integr. Neurosci.* 8, pp. 1-12.

Park, S., Jeong, K., Panupinthu, N., Yu, S., Lee, J., Han, J., Kim, J., Lee, J., Kang, J., Park, C., Mills, G. & Lee, H. (2010). Lysophosphatidic acid augments human hepatocellular carcinoma cell invasion through LPA1 receptor and MMP-9 expression. *Oncogene*, 30(11), pp.1351-1359.

Patel, M. & McGivan, J.D. Partial purification and properties of rat liver glutaminase (1984) *Biochem. J.* 220, pp. 583-590.

Pawlak, R., Rao, B., Melchor, J., Chattarji, S., McEwen, B. & Strickland, S. (2005). Tissue plasminogen activator and plasminogen mediate stress-induced decline of neuronal and cognitive functions in the mouse hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 102(50), pp.18201-18206.

Pedraza, C., Sánchez-López, J., Castilla-Ortega, E., Rosell-Valle, C., Zambrana-Infantes, E., García-Fernández, M., Rodriguez de Fonseca, F., Chun, J., Santín, L.J. & Estivill-Torrús, G. (2014). Fear extinction and acute stress reactivity reveal a role of LPA_1 receptor in regulating emotional-like behaviors. *Brain Struct. Func.* 219, pp.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1659-1672.

Perera, Y., Voith, D.M. & Curthoys, N.P. (1991) Biosynthesis and processing of mitochondrial glutaminase in HTC hepatoma cells. *Biochem. J.* 273, pp. 265-270.

Pérez-Gómez, C., Campos-Sandoval, J.A., Alonso, F.A., Segura, J.A., Manzanares, E., Ruiz-Sánchez, P., González, M.E., Márquez, J., Matés, J.M. (2005). Co-expression of glutaminase K and L isoenzymes in human tumour cells. *Biochem. J.* 386, pp. 535–542.

Pérez-Gómez, C., Matés, J.M., Gómez-Fabre, P.M., del Castillo-Olivares, A., Alonso, F.J. & Márquez, J. (2003). Genomic organization and transcriptional analysis of the human l-glutaminase gene. *Biochem. J.* 370 (3), pp. 771-784.

Pierce, R.C. & Kalivas, P.W. (1997). A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain. Res. Brain Res. Rev.* 25, pp. 192-216.

Pipel Y. & Segal, M. (2006). The role of LPA1 in formation of synapses among cultured hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 97, pp. 1379-1392.

Planas, A.M., Solé, S. & Justicia, C. (2001). Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat brain after transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol. Dis.* 8(5), pp. 834-46.

Ponting, C.P. (1997). Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants. *Protein. Sci.* 6(2), pp. 464-8.

Porter, L.D., Ibrahim, H., Taylor, L. & Curthoys, N.P. (2002). Complexity and species variation of the kidney-type glutaminase gene. *Physiol.Genomics* 9 (3), pp. 157-166.

Pradet-Balade, B., Boulmé, F., Beug, H., Müllner, E. & Garcia-Sanz, J. (2001). Translation control: bridging the gap between genomics and proteomics?. *Trends Biochem. Sci.* 26(4), pp.225-229.

Quintero, G. (2013). Role of nucleus accumbens glutamatergic plasticity in drug addiction. *Neuropsychiatr.Dis.Treat*. 9, pp.1499-1512.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Ramírez, M., Fernández-González, R., Pérez-Crespo, M., Pericuesta, E. & Gutiérrez-Adan, A. (2009). Effect of Stem Cell Activation, Culture Media of Manipulated Embryos, and Site of Embryo Transfer in the Production of F0 Embryonic Stem Cell Mice. *Biol. Reprod.*, 80(6), pp.1216-1222.

Ramos-DeSimone, N., Hahn-Dantona, E., Sipley, J., Nagase, H., French, D. & Quigley, J. (1999). Activation of Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) via a Converging Plasmin/Stromelysin-1 Cascade Enhances Tumor Cell Invasion. *J. Biol. Chem.* 274 (19), pp.13066-13076.

Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A. & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols* 8, 11, pp. 2281-2289.

Riefler, G.M. & Firestein, B.L. (2001). Binding of neuronal nitric-oxide synthase (nNOS) to carboxyl-terminal-binding protein (CtBP) changes the localization of CtBP from the nucleus to the cytosol: a novel function for targeting by the PDZ domain of nNOS. *J. Biol. Chem.* 276(51), pp. 48262-8.

Ringwald, M., Iyer, V., Mason, J.C., Stone, K.R., Tadepally, H.D., Kadin, J.A., Bult, C.J., Eppig, J.T., Oakley, D.J., Briois, S., Stupka, E., Maselli, V., Smedley, D., Liu, S., Hansen, J., Baldock, R., Hicks, G.G. & Skarnes, W.C. (2011). The IKMC web portal: a central point of entry to data and resources from the International Knockout Mouse Consortium. *Nucleic Acids Res*. 39, pp. 849-855.

Rivera, S., Khrestchatisky, M., Kaczmarek, L., Rosenberg, G. & Jaworski, D. (2010). Metzincin Proteases and Their Inhibitors: Foes or Friends in Nervous System Physiology?. *J. Neurosci.* 30(46), pp.15337-15357.

Roberts, C., Winter, P., Shilliam, C., Hughes, Z., Langmead, C., Maycox, P. & Dawson, L. (2005). Neurochemical Changes in LPA1 Receptor Deficient Mice – A Putative Model of Schizophrenia. *Neurochem. Res*, 30(3), pp.371-377.

Ronesi, J. & Huber, K. (2008). Homer Interactions Are Necessary for Metabotropic Glutamate Receptor-Induced Long-Term Depression and Translational Activation. *J. Neurosci.* 28(2), pp.543-547.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

De la Rosa, V., Campos-Sandoval, J.A., Martín-Rufián, M., Cardona, C., Matés, J.M., Segura, J.A., Alonso, F.J. & Márquez, J. (2009). A novel glutaminase isoform in mammalian tissues. *Neurochem. Int.* 55, pp. 76-84.

Sachdev, S., Hoffmann, A. & Hannink, M. (1998). Nuclear Localization of IkBa Is Mediated by the Second Ankyrin Repeat: the IkBa Ankyrin Repeats Define a Novel Class of cis-Acting Nuclear Import Sequences. *Mol. Cell. Biol*.18 (5), pp. 2524–2534.

Samochowiec, A., Grzywacz, A., Kaczmarek, L., Bienkowski, P., Samochowiec, J., Mierzejewski, P., Preuss, U., Grochans, E. & Ciechanowicz, A. (2010). Functional polymorphism of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene in alcohol dependence: Family and case control study. *Brain Research*, 1327, pp.103-106.

Sanders, M. & Kon, C. (1992). Glutamine and glutamate metabolism in normal and heat shock conditions inDrosophila Kc cells: Conditions supporting glutamine synthesis maximize heat shock polypeptide expression. *J. Cell. Physiol.*, 150(3), pp.620-631.

Santin, L.J., Bilbao, A. , Pedraza, C., Matas-Rico, E., López-Barroso, D., Castilla-Ortega, E., Sánchez-López, J., Riquelme, R., Varela Nieto, I., de la Villa, P., Suardíaz, M., Chun, J., Rodríguez De Fonseca, F. & Estivill-Torrús, G. (2009). Behavioral phenotype of maLPA-null mice: increased anxiety-like behavior and spatial memory déficits. *Genes, Brain Behav.* 8, pp. 772-784.

Sayas, C., Moreno-Flores, M., Avila, J. & Wandosell, F. (1999). The Neurite Retraction Induced by Lysophosphatidic Acid Increases Alzheimer's Disease-like Tau Phosphorylation. *JBC*, 274(52), pp.37046-37052.

Scavizzi, F., Ryder, E., Newman, S., Raspa, M., Gleeson, D., Wardle-Jones, H., Montoliu, L., Fernández, A., Dessain, M.L., Larrigaldie, V., Khorshidi, Z., Vuolteenaho, R., Soininen, R., André, P., Jacquot, S., Hong, Y., de Angelis, M.H., Ramírez-Solís, R., Doe, B. (2015). Blastocyst genotyping for quality control of mouse mutant archives: an ethical and economical approach. *Transgenic Res.*(5), pp. 921-7.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Scofield, M. & Kalivas, P. (2014). Astrocytic Dysfunction and Addiction: Consequences of Impaired Glutamate Homeostasis. *Neuroscientist*, 20(6), pp.610-622.

Shapiro, R.A, Farrell, L., Srinivasan, M. & Curthoys, N.P. (1991). Isolation, characterization and in vitro expression of a cDNA that encodes the kidney isoenzyme of the mitochondrial glutaminase. *J. Biol. Chem.* 266, pp. 18792-18796.

Shen, J. (2006). 13C Magnetic Resonance Spectroscopy Studies of Alterations in Glutamate Neurotransmission. *Biol. Psychiatry*, 59(10), pp.883-887.

Sheng, X., Yung, Y-C., Chen, A &, Chun, J. (2015). Lysophosphatidic acid signalling in development. *Development* 142, pp. 1390-1395.

Skarnes, W.C., Rosen, B., West, A.P., Koutsourakis, M., Bushell, W., Iyer, V., Mujica, A.O., Thomas, M., Harrow, J., Cox, T., Jackson, D., Severin, J., Biggs, P., Fu, J., Nefedov, M., de Jong, P.J., Stewart, F. & Bradley, A. (2011). A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature* 474, pp. 337-42.

Smith, E.M. & Watford, M. (1988). Rat hepatic glutaminase: Purification and immunochemical characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* 260 (2), pp. 740-751.

Souba, W. (1987). Review: Interorgan Ammonia Metabolism in Health and Disease: A Surgeon's View. *J. Parenter. Enteral Nutr.* 11 (6), pp.569-579.

Spohr, T., Choi, J., Gardell, S., Herr, D., Rehen, S., Gomes, F. & Chun, J. (2008). Lysophosphatidic Acid Receptor-dependent Secondary Effects via Astrocytes Promote Neuronal Differentiation. *J.Biol.Chem.* 283(12), pp.7470-7479.

Stawarski, M., Stefaniuk, M. & Wlodarczyk, J. (2014). Matrix metalloproteinase-9 involvement in the structural plasticity of dendritic spines. *Front. Neuroanat.* Review 8, 68.

Steketee, J. & Kalivas, P. (2011). Drug Wanting: Behavioral Sensitization and Relapse to Drug-Seeking Behavior. *Pharmacol. Rev*. 63(2), pp.348-365.

Sternberg, N. & Hamilton, D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

I. Recombination between loxP sites. *J. Mol. Biol.* 25; 150(4), pp. 467-86.

Szeliga, M., Matyja, E., Obara, M., Grajkowska, W., Czernicki, T.& Albrecht, J. (2008). Relative expression of mRNAS coding for glutaminase isoforms in CNS tissues and CNS tumors. *Neurochem. Res.* 33, pp. 808–813

Szeliga, M., Obara-Michlewska, M., Matyja, E., Łazarczyk, M., Lobo, C., Hilgier, W., Alonso, F., Márquez, J. & Albrecht, J. (2009). Transfection with liver-type glutaminase cDNA alters gene expression and reduces survival, migration and proliferation of T98G glioma cells. *Glia*, 57(9), pp.1014-1023.

Szeliga, M., Sidoryk, M., Matyja, E., Kowalczyk, P. & Albrecht, J. (2005). Lack of expression of the liver-type glutaminase (LGA) mRNA in human malignant gliomas. *Neurosci. Lett.* 374(3), pp.171-173.

Tang, A. & Curthoys, N.P. (2001). Identification of z-Crystallin/NADPH:Quinone Reductase as a Renal Glutaminase mRNA pH Response Element-binding Protein. . *Pharmacol. Rev.* 276 (24), pp. 21375–21380.

Taylor, L. & Curthoys, N. (2004). Glutamine metabolism: Role in acid-base balance. *Biochem. Mol. Biol. Educ*. 32(5), pp.291-304.

Teo, S., Yung, Y., Herr, D. & Chun, J. (2009). Lysophosphatidic acid in vascular development and disease. *IUBMB Life*, 61(8), pp.791-799.

Testa, G., Schaft, J., Van der Hoeven, F., Glasser, S., Anastassiadis, K., Zhang, Y., Hermann, T., Stremmel, W. & Stewart, F. (2004). A reliable lacZ expression reporter cassette for a multipurpose, knockout-first alleles. *Genesis* 38, pp. 151-158.

Thangavelu, K., Pan, C., Karlberg, T., Balaji, G., Uttamchandani, M., Suresh, V., Schuler, H., Low, B. & Sivaraman, J. (2012). Structural basis for the allosteric inhibitory mechanism of human kidney-type glutaminase (KGA) and its regulation by Raf-Mek-Erk signaling in cancer cell metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 109(20), pp.7705-7710.

Thomas, K. & Capecchi, M. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 51(3), pp.503-512.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Thomas, J., Novelli, A., Tao-Cheng, J., Henneberry, R., Smith, H. & Banner, C. (1989). Developmental induction of glutaminase in primary cultures of cerebellar granule cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 6(1), pp.47-54.

Tosina, M. (2015). Regulación transcripcional del gen *Gls2* y obtención de células madre embrionarias transformadas para generación de ratones *knockout*. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga.

Turner, A. & McGivan, J.D. (2003). Glutaminase isoform expression in cell lines derived from human colorectal adenomas and carcinomas. *Biochem. J.* 370, pp. 403- 408.

Tzschentke, T.M. & Schmidt, W.J. (2003). Glutamatergic mechanisms in addiction. *Mol. Psychiatry* 8, pp. 373-382.

Valet, P., Pagès, C., Jeanneton, O., Daviaud, D., Barbe, P., Record, M., Saulnier-Blache & J. S., Lafontan, M. (1998). *J. Clin. Invest. 1*01**,** pp**.** 1431–1438.

Van den Oever, M., Spijker, S., Smit, A. & De Vries, T. (2010). Prefrontal cortex plasticity mechanisms in drug seeking and relapse. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35(2), pp.276-284.

Van Meer, G., Voelker, D.R. & Feigenson, G.W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, pp. 112-124.

Van Meeteren L.A, Ruurs, P., Stortelers, C., Bouwman, P., Van Rooijen, M.A, Pradère, J.P., Pettit, T.R., Wakelam, M.J., Saulnier-Blache, J.S. & Mummery, C.L. (2006). Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol. Cell. Biol.* 26, pp. 5015–5022.

Van Wart, H.E. & Birkedal-Hansen, H. (1990). The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 87, pp. 5578-5582.

Velletri, T., Romeo, F., Tucci, P., Peschiaroli, A., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Niklison-Chirou, M., Amelio, I., Knight, R., Mak, T., Melino, G. & Agostini, M. (2013).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

GLS2 is transcriptionally regulated by p73 and contributes to neuronal differentiation. *Cell Cycle*, 12(22), pp.3564-3573.

Verslegers, M., Lemmens, K., Van Hove, I. & Moons, L. (2013). Matrix metalloproteinase-2 and -9 as promising benefactors in development, plasticity and repair of the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 105, pp. 60-78.

Waagepetersen, H., Qu, H., Sonnewald, U., Shimamoto, K. & Schousboe, A. (2005). Role of glutamine and neuronal glutamate uptake in glutamate homeostasis and synthesis during vesicular release in cultured glutamatergic neurons. *Neurochem. Int.* 47(1-2), pp.92-102.

Walls, A., Waagepetersen, H., Bak, L., Schousboe, A. & Sonnewald, U. (2014). The Glutamine–Glutamate/GABA Cycle: Function, Regional Differences in Glutamate and GABA Production and Effects of Interference with GABA Metabolism. *Neurochem. Res*, 40(2), pp.402-409.

Wang, X., Bozdagib, O., Nikitczukb, J.S., Wei Zhaib, Z., Zhoua,Q. & Huntleyb, G.W. (2008). Extracellular proteolysis by matrix metalloproteinase-9 drives dendritic spine enlargement and long-term potentiation coordinately. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 105, 49, pp. 19519–19524.

Wang Y., Huang Y., Zhao L., Li Y.& Zheng J. (2014). Glutaminase 1 is essential for the differentiation, proliferation, and survival of human neural progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 23, pp. 2782-2790.

Waterhouse, E., An, J., Orefice, L., Baydyuk, M., Liao, G., Zheng, K., Lu, B. & Xu, B. (2012). BDNF Promotes Differentiation and Maturation of Adult-born Neurons through GABAergic Transmission. *J. Neurosci.* 32(41), pp.14318-14330.

Xi, Z, Ramamoorthy, S., Baker, D.A., Shen, H., Samuvel, D.J. & Kalivas, P.W. (2002). Modulation of Group II Metabotropic Glutamate Receptor Signaling by Chronic Cocaine. *J. Pharm. Exp. Ther.* 303(2), pp.608-615.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Yagi, T., Ikawa, Y., Yoshida, K., Shigetani, Y., Takeda, N., Mabuchi, I., Yamamoto, T. & Aizawa, S. (1990). Homologous recombination at c-fyn locus of mouse embryonic stem cells with use of diptheria toxin A-fragment gene in negative selection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 87, pp. 9918–9992.

Yamamoto, K., Sakagami, Y., Sugiura, S., Inokuchi, K., Shimohama, S. & Kato, N. (2005). Homer 1a enhances spike-induced calcium influx via L-type calcium channels in neocortex pyramidal cells. *Eur. J. Neurosci.* 22(6), pp.1338-1348.

Yu, Y., Qin, J., Liu, M., Ruan, Q., Li, Y. & Zhang, Z. (2014). Role of Rho kinase in lysophosphatidic acid-induced altering of blood-brain barrier permeability. *Int.J.Mol.Med.* 33 (3), pp. 661-669.

Yung, Y.C., Stoddard, N.C. & Chun, J. (2014). LPA Receptor Signaling: Pharmacology, Physiology, and Pathophysiology. *J. Lipid Res.* 18;55(7), pp. 1192-1214.

Zhu, Y. Romero, M.I., Ghosh, P., Ye, Z., Charnay, P., Rushing, E.J., Marth, J.D. & Parada, L.F. (2001). Ablation of NF1 function in neurons induces abnormal development of cerebral cortex and reactive gliosis in the brain. *Genes Dev.* 15(7), pp.859-876.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA