



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Tesis de Doctorado en Bioquímica

# Modulación molecular de la función del receptor neuronal $\alpha 7$

Matías Lasala

Bahía Blanca

Argentina

2019





UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

**Tesis de Doctorado en Bioquímica**

# **Modulación molecular de la función del receptor neuronal $\alpha 7$**

Matías Lasala

Bahía Blanca

Argentina

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el ...../...../....., mereciendo la  
calificación de .....(.....).

# Prefacio

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Bioquímica de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en Laboratorio de Neurofisiología y Farmacología Molecular del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca, dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y de la Universidad Nacional del Sur, durante el período comprendido entre el 4 de noviembre de 2014 y el 19 de marzo de 2019, bajo la dirección de la Doctora Cecilia Bouzat, Investigadora Superior de CONICET y Profesora Adjunta de Farmacología II en la Universidad Nacional del Sur.

# Agradecimientos



En primer lugar, quiero agradecer a la Universidad Nacional del Sur, lugar amado en el que pude capacitarme, tanto en lo académico como en lo personal, con cada profesor o ayudante que ofrecieron lo mejor de ellos para transmitirme, más allá de contenidos académicos, el respeto por nuestra profesión y la responsabilidad que la misma conlleva. En el mismo sentido al INIBIBB y al CONICET, quienes me brindaron además el espacio físico y el sustento económico para poder desarrollar mis estudios de posgrado.

A las personas que hacen el INIBIBB que, más allá de lo institucional, siempre me han aportado su ayuda. Especialmente a Leti Cabral, por toda la paciencia, los consejos y el cariño.

A mis compañeros del laboratorio, que han soportado estoicamente toda clase de improperios cuando las cosas no salían exactamente como esperaba. Gracias por ello a Noe, Facu, Eli, Jere, Juli, y Guille. Merece una mención especial Anita, quien además de contarme todos los secretos para lograr las mejores *maxipreps*, ha sido testigo en primera persona de los momentos difíciles, dándome siempre una palabra o un abrazo que simplificó las cosas.

Al resto de mis compañeros becarios del INIBIBB, especialmente a Marce, Leti Nicasio (sí, ya sé que «no va acá», pero para mí sos una más de nosotros), Flor,

Facu Prado, Yane, Marcos, Meli y Nati, quienes siempre estuvieron dispuestos a ayudarme, fueran nuestras intenciones científicas o catárticas. Nos quedará pendiente alguna choripaneada o *after-lab* para la próxima.

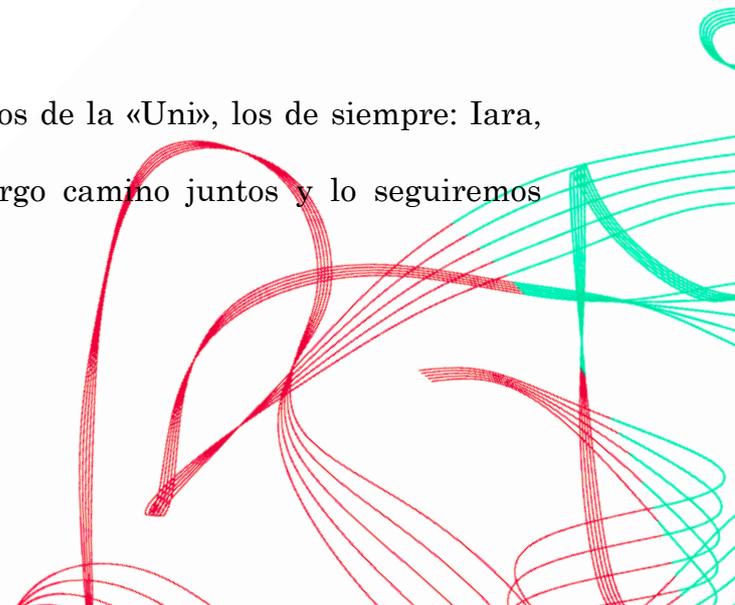
A mis compañeras de la cátedra de Fisiología Humana, de quienes aprendí muchísimo año a año, y junto a quienes enfrentamos grandes desafíos. ¿Vieron que podíamos?

A mis amigas de la manzanita (🍏), Carmen y Ari, por ayudarme, escucharme y hacerme reír a diario; *for making me switch to iOS*; y por permitirme siempre sustraer alimentos de su oficina, la mejor decorada del instituto. Han sido uno de los más grandes sostenes en estos últimos años, dentro y fuera del laboratorio.

Especial agradecimiento merece una persona que siempre creyó en mí, mucho más de lo que yo mismo pudiera creer, frente a todas las dificultades que se me presentaron. Gracias Ceci por no dejarme bajar los brazos y por enseñarme a valorar cada paso que aprendí a dar. No podría haber tenido una mejor directora.

A Orne y Cami, mis biólogas preferidas, por transformar radicalmente mis días en el laboratorio y permitirme compartir con ustedes tantas tardes en el «cuartito de la alegría», que, ¡Oh! casualidad, eran las que arrojaban los mejores resultados. No sé si hubiera podido concluir este proyecto sin su presencia en mi trabajo y en mi vida.

A mis hermanos del alma, los cinco, los de la «Uni», los de siempre: Iara, May, Anto, Fede y Jesi. Recorrimos un largo camino juntos y lo seguiremos haciendo.



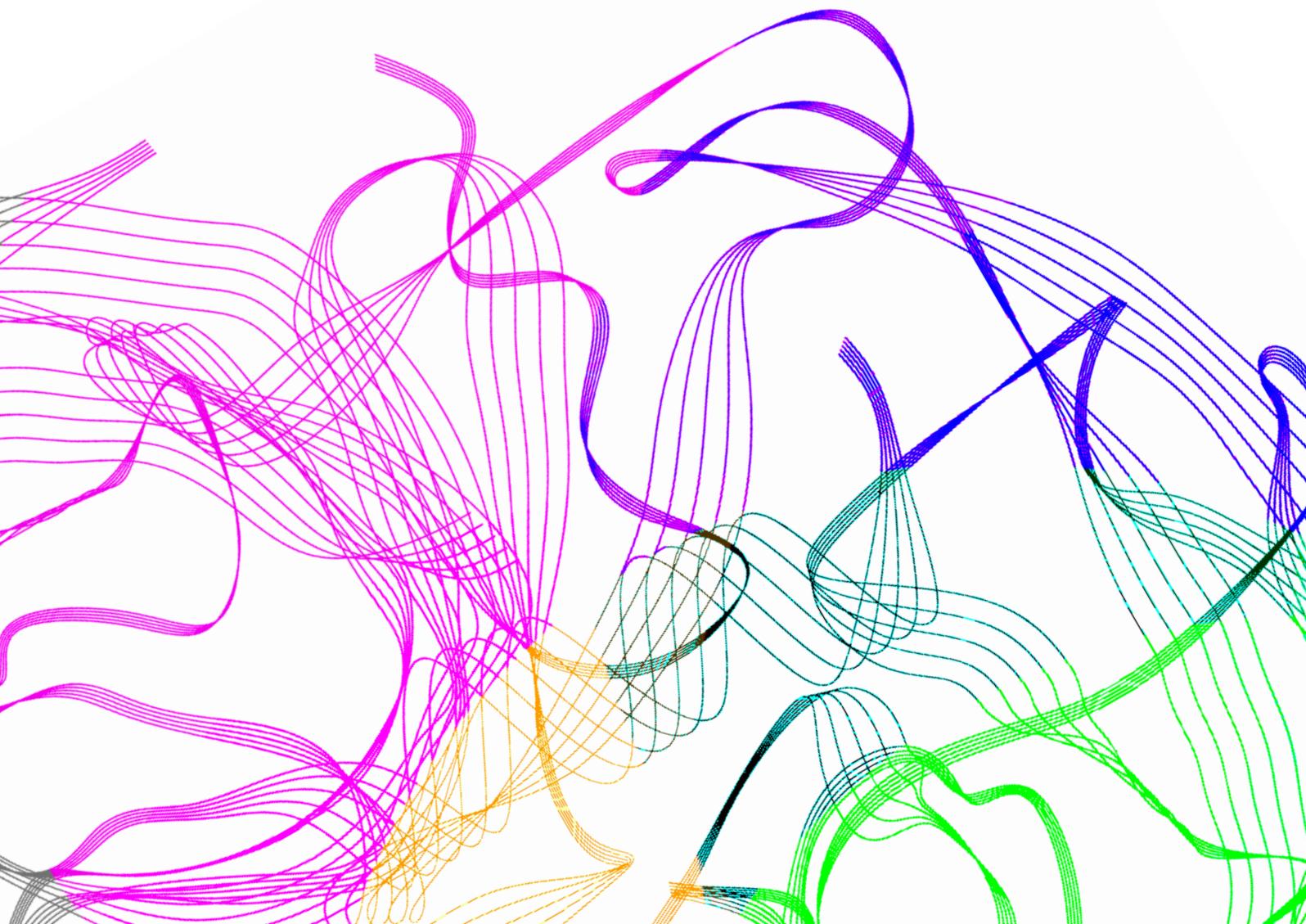
Y en último y más importante lugar, a mis padres. No alcanzan las palabras para agradecerles a ustedes, sin cuyo apoyo y amor no hubiera podido alcanzar esta meta.

19 de marzo de 2019

Matías Lasala

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR



# MODULACIÓN MOLECULAR DE LA FUNCIÓN DEL RECEPTOR NEURONAL $\alpha 7$

## RESUMEN

El sistema nervioso está formado por una compleja red de billones de neuronas que utilizan señales específicas para comunicarse entre sí. La sinapsis química es una unión funcional entre neuronas en la que el neurotransmisor liberado por una de ellas interactúa específicamente con proteínas de membrana de la otra, los receptores postsinápticos.

Los receptores de la familia *cys-loop*, que incluye al receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR, *nicotinic acetylcholine receptor*), son miembros de la superfamilia de los canales pentaméricos activados por ligando (pLGICs, *pentameric ligand-gated ion channels*). Están formados por cinco subunidades iguales - receptores homoméricos - o diferentes - receptores heteroméricos -. Los receptores poseen un dominio extracelular, que contiene los sitios de unión al agonista localizados entre dos subunidades adyacentes; un dominio transmembrana, que forma el canal y contiene sitios alostéricos para la acción de moduladores; y un dominio intracelular, de importancia en la conductancia del canal y en su modulación intracelular.

El receptor  $\alpha 7$  es el prototipo de receptor homopentamérico de la familia de los nAChRs. Es uno de los nAChRs más abundantes en el sistema nervioso, aunque también se encuentra presente en otros tejidos. En neuronas modula la liberación de neurotransmisores e induce respuestas estimuladoras, contribuyendo a la cognición, el procesamiento de la información sensorial y la memoria. En tejidos no neuronales está involucrado en inmunidad, inflamación y

neuroprotección. Debido a sus múltiples funciones, emerge actualmente como nuevo blanco terapéutico para desórdenes neurológicos e inflamatorios.

En el primer capítulo de este trabajo de tesis exploramos el rol funcional de una subunidad truncada del receptor  $\alpha 7$  específica de humanos,  $\text{dup}\alpha 7$ . Dicha subunidad, que carece de una región del dominio N-terminal extracelular que comprende parte del sitio de unión al ligando, se encuentra asociada con desórdenes neurológicos e inmunomodulación. Utilizando expresión heteróloga en células de mamífero en conjunto con microscopía de fluorescencia y registros de electrofisiología mediante la técnica de *patch clamp*, determinamos que: i)  $\text{dup}\alpha 7$  no es capaz de formar homopentámeros funcionales activables por acetilcolina o por un agonista alostérico; ii) La subunidad  $\text{dup}\alpha 7$  puede combinarse con la subunidad  $\alpha 7$  para formar heteropentámeros de diferentes estequiometrías, con características cinéticas similares a las del receptor  $\alpha 7$ ; iii) Es necesaria la presencia de al menos dos subunidades  $\alpha 7$  ubicadas en forma consecutiva en el heteropentámero para que los receptores sean funcionales; iv) La expresión conjunta de  $\text{dup}\alpha 7$  y  $\alpha 7$  disminuye la disponibilidad de sitios de unión al agonista, reduciendo la sensibilidad de los receptores. En forma global, nuestros resultados muestran que la subunidad  $\text{dup}\alpha 7$  posee un rol modulador negativo sobre la actividad del receptor  $\alpha 7$ .

En el segundo capítulo, se evaluó la modulación de los péptidos  $\beta$ -Amiloide 1-40 y 1-42 sobre el receptor  $\alpha 7$ . Dichos péptidos poseen un rol fundamental en la enfermedad de Alzheimer, dado que su acumulación excesiva en el cerebro provoca la formación de placas seniles, a partir de las cuales se desarrolla un proceso de neurodegeneración e inflamación. Sin embargo, evidencias más recientes sugieren

que son las formas oligoméricas de  $\beta$ -Amiloide las especies más neurotóxicas. Empleando estudios espectrofluorimétricos y la técnica de *patch clamp* demostramos que: i) Los oligómeros  $\beta$ -Amiloide provocan cambios conformacionales en el receptor  $\alpha 7$  que pueden ser detectados por la sonda conformacional cristal violeta; ii) Los oligómeros de péptidos  $\beta$ -Amiloide son capaces de activar al receptor  $\alpha 7$  en concentraciones del orden picomolar o nanomolar bajo; iii) Los oligómeros  $\beta$ -Amiloide reducen la potenciación de  $\alpha 7$  por moduladores alostéricos positivos (PAMs, *positive allosteric modulators*) a concentraciones del orden nanomolar o micromolar bajo; iv) La reducción de la potenciación causada por los péptidos  $\beta$ -Amiloide no es específica del tipo de modulador alostérico positivo. Estos resultados demuestran un rol dual, dependiente de la concentración, de los oligómeros de  $\beta$ -Amiloide como agonistas y como moduladores negativos de  $\alpha 7$ . El efecto inhibitorio podría contribuir al deterioro cognitivo asociado a la enfermedad de Alzheimer.

Por último, en el tercer capítulo se evaluó la acción del ion  $\text{Ca}^{2+}$  como modulador alostérico positivo de  $\alpha 7$ . Existen reportes sobre cationes divalentes que actúan como moduladores de los pLGICs, variando su efecto según el tipo de receptor. Sobre  $\alpha 7$ , el ion  $\text{Ca}^{2+}$  actúa como un PAM, pero la base mecánica de esta acción no ha sido explorada. Combinando registros de corrientes macroscópicas y de canal único en las configuraciones *cell-attached* e *inside-out* de la técnica de *patch clamp* demostramos que: i) La presencia del ion  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular potencia la respuesta macroscópica a acetilcolina y a colina dependiendo de la concentración de agonista; ii) La ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en la solución extracelular disminuye la frecuencia de apertura del canal y aumenta levemente

la corriente unitaria; iii) El mecanismo por el cual el ion  $\text{Ca}^{2+}$  potencia la respuesta al agonista es compatible con el aumento de la probabilidad de apertura del canal. De este modo, identificamos el mecanismo asociado a la acción moduladora de calcio sobre el receptor  $\alpha 7$ .

Nuestros resultados contribuyen al entendimiento de la modulación del receptor  $\alpha 7$  por una subunidad proteica asociada con enfermedades neurológicas, por péptidos amiloides producidos en patologías neurodegenerativas y por el catión  $\text{Ca}^{2+}$ , todos procesos de relevancia en la señalización colinérgica en el sistema nervioso central.

# MOLECULAR MODULATION OF THE NEURONAL $\alpha 7$ RECEPTOR FUNCTION

## SUMMARY

The nervous system is formed by a complex net of billions of individual neurons that use specific signals to communicate with each other. The chemical synapse is a functional union between neurons in which the neurotransmitter released by one neuron interacts specifically with integral membrane proteins of the other neuron: the postsynaptic receptors.

The receptors of the *cys-loop* family, that includes the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR), are members of the superfamily of the pentameric ligand-gated ion channels family (pLGICs). They are formed by five identical - homopentameric receptors - or different subunits – heteropentameric receptors -. The receptors have an extracellular domain, which contains the agonist binding sites that are located between two adjacent subunits; a transmembrane domain that forms the channel and contains allosteric sites for the action of modulators; and an intracellular domain, important for the conductance of the channel and modulation.

The  $\alpha 7$  receptor is a homopentamer of the nAChRs family. It is one of the most abundant nAChRs in the nervous system and is also present in cells of other tissues. In neurons, it modulates the neurotransmitters release and induces stimulatory responses, thus contributing to cognition, sensory information processing and memory. In non-neuronal tissues, it is involved in immunity, inflammation and neuroprotection. Because of its multiple functions, it is emerging as a new therapeutic target for neurologic and inflammatory disorders.

In the first chapter of this thesis we evaluated the functional role of a human-specific truncated subunit of the  $\alpha 7$  receptor, dup $\alpha 7$ . This subunit, which lacks part of the N-terminal extracellular ligand-binding domain, is associated with neurological disorders and immunomodulation. Using heterologous expression of heteropentamers in mammalian cells combined with fluorescence microscopy and *patch clamp* recordings, we determined that: i) dup $\alpha 7$  is not able to form functional receptors activated by acetylcholine or an allosteric agonist; ii) dup $\alpha 7$  subunits can combine with  $\alpha 7$  subunits to form heteropentamers of different stoichiometries, with similar kinetic properties to those of  $\alpha 7$ ; iii) the presence of at least two  $\alpha 7$  subunits located consecutively in the heteropentamer forming an agonist binding site is necessary for functional heteropentamers; iv) the co-expression of dup $\alpha 7$  and  $\alpha 7$  decreases the availability of agonist binding sites, reducing the sensibility of the receptors. Overall, our results show that dup $\alpha 7$  has a negative modulatory role on the activity of the  $\alpha 7$  receptor.

In the second chapter, we evaluated the modulation of  $\alpha 7$  receptor by Amyloid- $\beta$  1-40 and 1-42 peptides. These peptides play a fundamental role in Alzheimers' disease since their excessive accumulation in the brain causes the formation of senile plaques, from which a process of neurodegeneration and inflammation develops. More recent evidence suggests that the oligomeric forms of amyloid- $\beta$  are the most neurotoxic species. Using spectrofluorimetric and electrophysiological studies we demonstrated that: i) The amyloid- $\beta$  peptides cause conformational changes on the  $\alpha 7$  receptor that can be sensed by the crystal violet conformational probe; ii) The oligomers of the amyloid- $\beta$  peptide are capable of activating the  $\alpha 7$  receptor at picomolar or low nanomolar concentrations; iii) The

oligomers of the amyloid- $\beta$  peptide reduce  $\alpha 7$  potentiation by positive allosteric modulators (PAMs) at nanomolar or low-micromolar concentrations; iv) The reduction in the potentiation caused by the amyloid- $\beta$  peptides is not specific of the PAM type. Our results demonstrate a dual role of the amyloid- $\beta$  oligomers as agonists and negative modulators of  $\alpha 7$ , depending on the concentration. The inhibitory effect could contribute to the cognitive impair associated to Alzheimer's disease.

Last, in the third chapter we evaluated the action of the  $\text{Ca}^{2+}$  cation as a PAM of  $\alpha 7$ . Divalent cations have been reported to modulate different pLGICs, varying their effects with the receptor type. On  $\alpha 7$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  acts as a PAM, but the mechanistic basis of this action has not been explored yet. Combining macroscopic and single-channel current recordings in the cell-attached and inside-out patch clamp configurations, we demonstrated that: i) Extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  potentiates the macroscopic responses to ACh and choline and the level of potentiation is dependent on the agonist concentration; ii) The absence of extracellular calcium diminishes the frequency of channel opening and slightly increases the unitary current; iii) The mechanism by which  $\text{Ca}^{2+}$  enhances the response to the agonist is compatible with an increase of the channel opening probability.

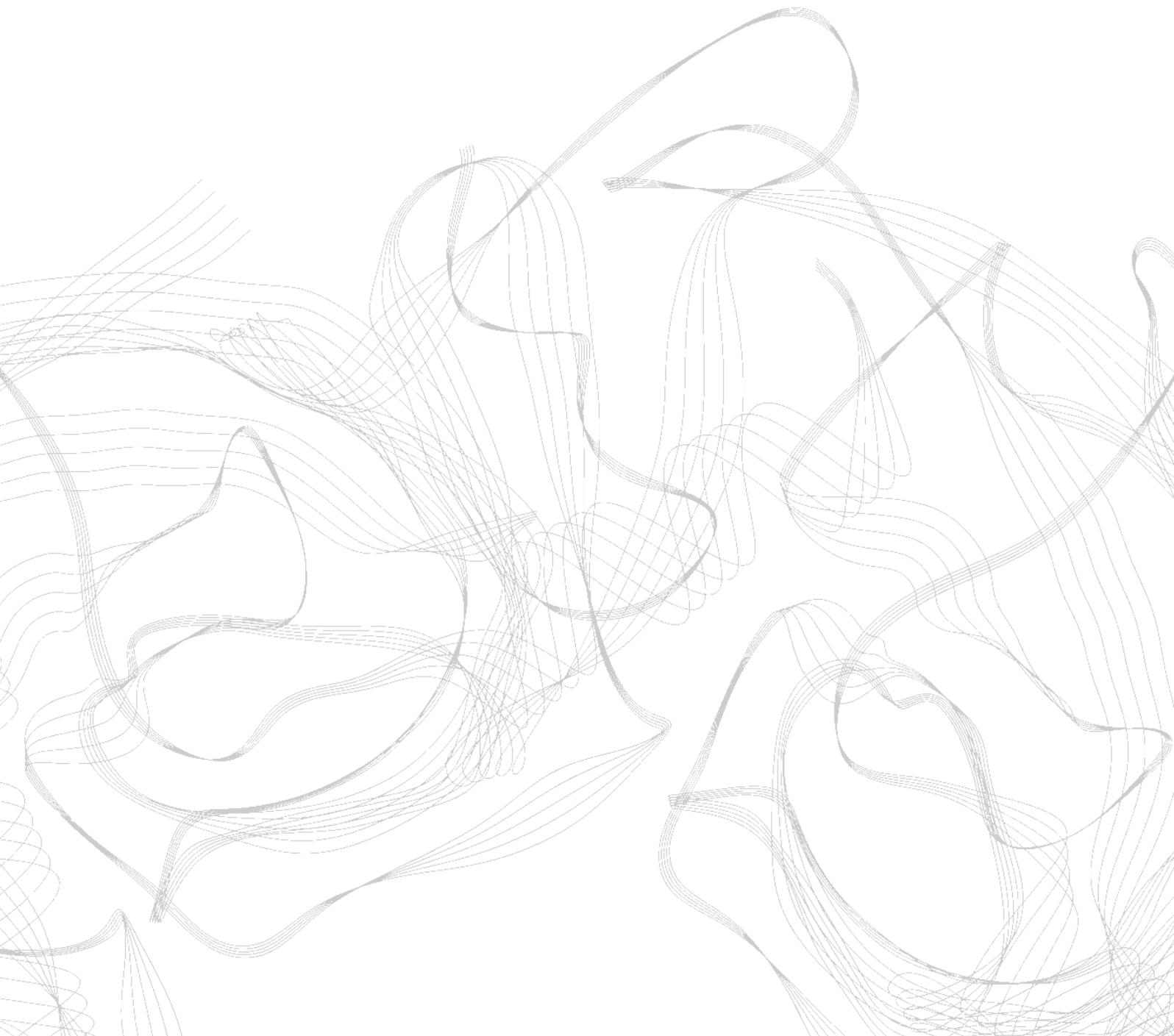
Our results contribute to the understanding of the molecular actions at  $\alpha 7$  of a truncated protein subunit associated with neurological diseases, of amyloid peptides produced in neurodegenerative pathologies and of the  $\text{Ca}^{2+}$  cation, which are all relevant modulatory processes of the cholinergic pathway at the central nervous system.

# ÍNDICE

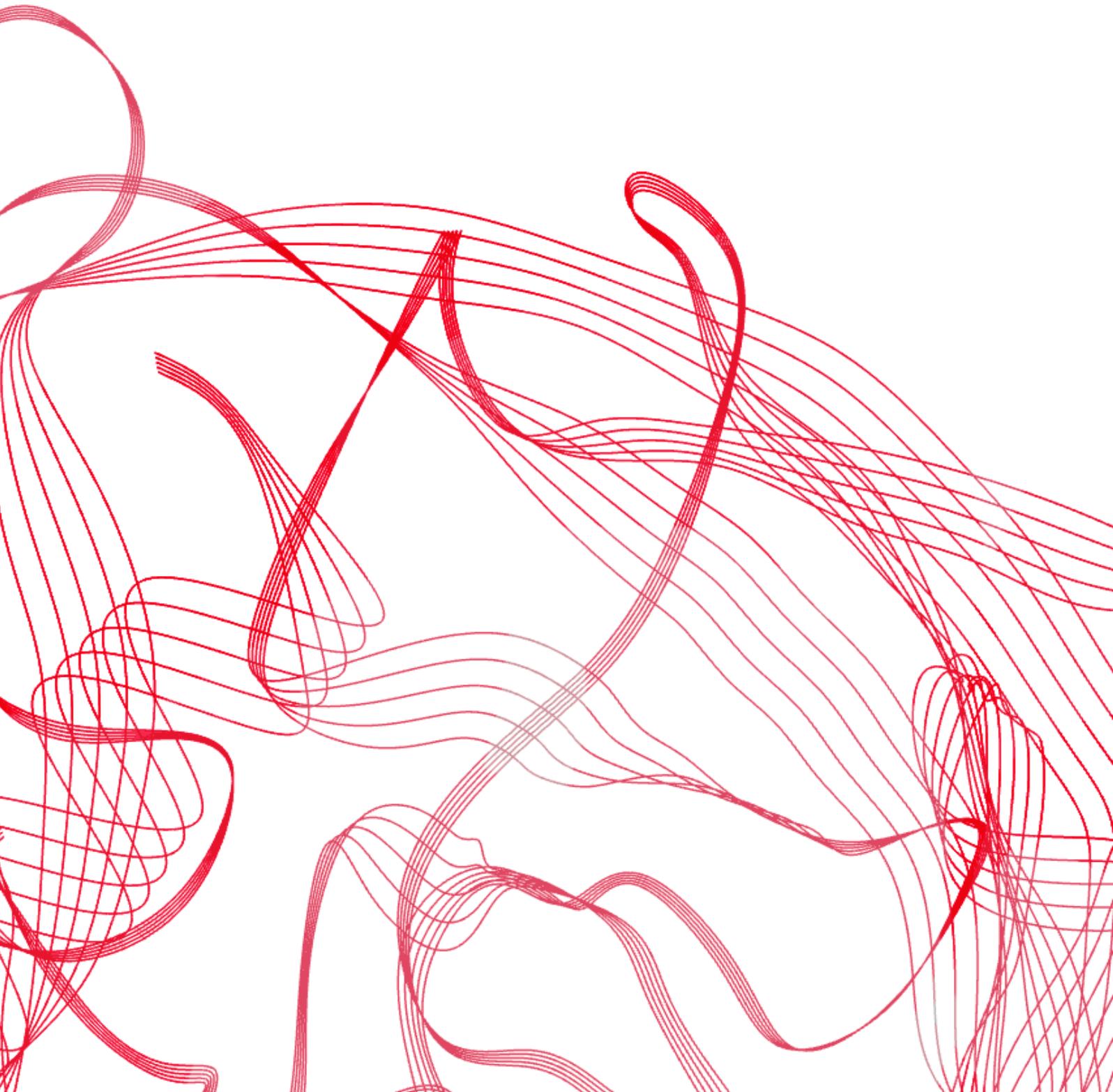
Resumen.....	I
Summary.....	V
Introducción.....	1
Sinapsis.....	3
Neurotransmisores.....	4
Acetilcolina.....	5
Receptores postsinápticos.....	7
Receptores <i>cys-loop</i> .....	8
Receptores de acetilcolina.....	9
Estructura general de los receptores <i>cys-loop</i> .....	10
Dominio extracelular.....	12
Sitio de unión del agonista.....	13
Dominio transmembrana.....	14
Dominio intracelular.....	17
Cambios conformacionales y respuesta de los receptores <i>cys-loop</i> .....	18
Activación.....	19
Receptor nicotínico $\alpha 7$ .....	20
Moduladores alostéricos positivos y agonistas alostéricos de $\alpha 7$ .....	25
Metodología.....	30
Expresión de subunidades de receptor en sistema heterólogo.....	31
Subunidades de receptor utilizadas.....	31
Subunidad $\alpha 7$ .....	31
Subunidad dupa $\alpha 7$ .....	31
Subunidades mutantes.....	31
Subunidades de baja conductancia.....	32
Subunidades con mutaciones en el sitio de unión de agonista.....	32
Cultivo celular.....	32
Transfección de células.....	33
Estudios de desplazamiento de unión de agonista.....	34
Marcación con $\alpha$ -Bungarotoxina.....	34
<i>Western blot</i> .....	35
<i>Patch clamp</i> .....	36
Compuestos químicos utilizados.....	36
Registros de canal único.....	37
Corrientes macroscópicas.....	42
Preparaciones de $\beta$ -Amiloide.....	43

Microscopía electrónica de transferencia.....	43
Estudios de cambios conformacionales en el receptor $\alpha 7$ .....	44
Mediciones fluorimétricas.....	44
Modelado molecular.....	45
Análisis estadístico.....	46
CAPÍTULO I. Modulación del receptor $\alpha 7$ por una subunidad $\alpha 7$ truncada..	47
Introducción.....	48
Objetivos.....	52
Resultados.....	53
Expresión heteróloga de dupa7 en células de mamífero.....	54
Detección de dupa7 mediante ensayos de microscopía confocal.....	55
Respuesta funcional de dupa7 frente a agonistas ortostéricos o alostéricos.....	57
Receptores heteroméricos $\alpha 7$ /dupa7 funcionales.....	61
Arreglo de subunidades de los receptores heteroméricos $\alpha 7$ /dupa7.....	69
Modelado molecular.....	72
Discusión.....	74
CAPÍTULO II. Modulación del receptor $\alpha 7$ por péptidos $\beta$ -Amiloide.....	83
Introducción.....	84
Objetivos.....	88
Resultados.....	89
Estado conformacional de los péptidos $\beta$ -Amiloide utilizados.....	90
Cambios conformacionales en $\alpha 7$ producidos por $\beta$ -Amiloide.....	90
Activación del receptor $\alpha 7$ por bajas concentraciones de $\beta$ -Amiloide oligomérico.....	93
Disminución por $\beta$ -Amiloide de la duración de los episodios de activación de $\alpha 7$ mediados por ACh.....	98
Efectos del $\beta$ -Amiloide sobre la potenciación de $\alpha 7$ con PAMs de distintos tipos.....	100
Discusión.....	103
CAPÍTULO III. Modulación del receptor $\alpha 7$ por calcio extracelular.....	111
Introducción.....	112
Objetivos.....	114
Resultados.....	115
Efectos del calcio extracelular sobre el pico de corriente y el tiempo necesario para alcanzarlo.....	116
Variación de la amplitud de la corriente unitaria en función del calcio extracelular.....	118

Efecto de la ausencia de calcio extracelular sobre la actividad de canal único.....	119
Discusión.....	122
Referencias.....	126
Abreviaturas.....	141
Publicaciones.....	144



# INTRODUCCIÓN



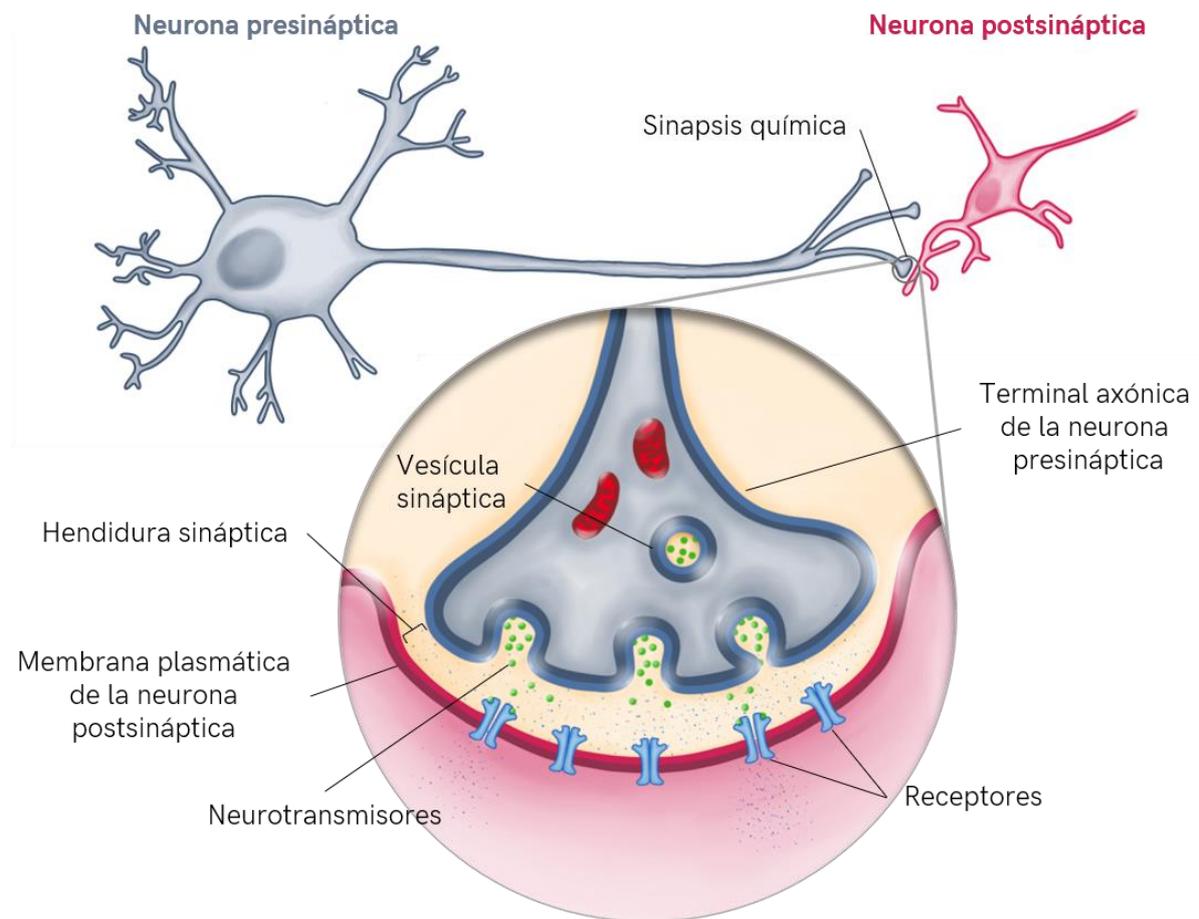
**E**l sistema nervioso está formado por una compleja red de billones de neuronas individuales que utilizan señales específicas para comunicarse entre sí, permitiéndonos construir nuestra percepción del mundo externo, fijar nuestra atención y controlar la maquinaria de nuestras acciones. Comprender esta organización nos permitirá entender el funcionamiento de la mente humana.

*En el siglo XIX los fisiólogos alemanes Emil DuBois-Reymond, Johannes Müller y Hermann von Helmholtz demostraron que la actividad eléctrica de una célula nerviosa afecta la actividad de una célula adyacente de modo predecible. A finales de ese mismo siglo, Claude Bernard en Francia, Paul Ehrlich en Alemania y John Langley en Inglaterra demostraron que las drogas no interactúan con las células arbitrariamente, sino que se unen a receptores específicos localizados típicamente en la membrana de la superficie celular. Este descubrimiento se convirtió en la base de los estudios fundamentales sobre las bases químicas de la comunicación entre células nerviosas.*

*En 1906 Santiago Ramón y Cajal recibió, junto a Camillo Golgi, el premio Nobel por su trabajo sobre el sistema nervioso, el cual aportó las primeras descripciones detalladas de las neuronas. Golgi desarrolló una tinción con sales de plata que reveló su estructura completa al microscopio, pudiendo evidenciar la existencia de dendritas y axones. En el curso de este trabajo, Ramón y Cajal sentó las bases de la «doctrina de la neurona», que establece que las neuronas individuales son las unidades de señalización elementales del sistema nervioso. (Kandel et al., 2000).*

## SINAPSIS

La sinapsis es el tipo de comunicación entre neuronas.



**Figura 1** Esquema general de la sinapsis química.

Existen dos tipos de sinapsis. En las sinapsis eléctricas hay contacto directo entre las membranas de las dos neuronas involucradas, produciéndose un pasaje de iones a través de uniones intercelulares en hendidura, directamente de un citoplasma al otro.

En las sinapsis químicas (figura 1), en cambio, las membranas plasmáticas de las neuronas involucradas se encuentran completamente separadas por un pequeño espacio de 20 a 30 nm, la hendidura sináptica. El neurotransmisor se encuentra almacenado en vesículas en la terminal axónica de la neurona

presináptica, cuya fusión con la membrana plasmática desencadena su liberación a la hendidura. Los neurotransmisores difunden rápidamente a través del espacio entre neuronas hasta encontrarse con receptores que se encuentran insertos en la membrana de la célula postsináptica, receptora del mensaje. Estos receptores reconocen al neurotransmisor, y de esta interacción depende la respuesta generada en la célula postsináptica.

La sinapsis química posee las ventajas de permitir la amplificación de la señal, la reversión de la polaridad neuronal dependiendo el tipo de receptor presente y un gran potencial para la modulación, todas propiedades importantes para las funciones superiores del cerebro (Bouzat, 2012).

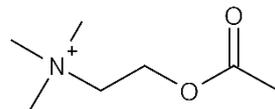
## **NEUROTRANSMISORES**

A principios del siglo pasado, John Langley estableció en sus investigaciones que en las células existen sustancias «jefe», necesarias para llevar a cabo las funciones principales de las células, tales como contracción, secreción o formación de productos metabólicos especiales; y sustancias receptoras especialmente capaces de cambiar y poner en acción a la sustancia «jefe» (Langley, 1905).

Los neurotransmisores son moléculas que, liberadas por una neurona en una sinapsis, afectan a una célula postsináptica, ya sea otra neurona o célula de un órgano efector (músculo o glándula), de una manera específica. Son sintetizados por la neurona presináptica y almacenados en vesículas hasta el momento de su liberación.

A pesar de que una variedad de compuestos químicos funciona como neurotransmisor, incluyendo pequeñas moléculas (ésteres, aminas y aminoácidos) y péptidos, la acción de un neurotransmisor en la célula postsináptica no depende tanto de las propiedades químicas del neurotransmisor como de las propiedades del receptor que reconoce y une al neurotransmisor. Dependiendo del receptor presente en la célula postsináptica, un mismo neurotransmisor puede excitar a algunas neuronas e inhibir a otras, e incluso en otras células producir ambos efectos. Es entonces el receptor el que define si una determinada sinapsis es excitatoria o inhibitoria.

## Acetilcolina



Acetilcolina

---

**Figura 2** Estructura química de la acetilcolina.

La acetilcolina (ACh, *Acetylcholine*, figura 2) es el primer neurotransmisor descubierto, caracterizada farmacológicamente por Henry Hallett Dale en 1915, y confirmada posteriormente como neurotransmisor por Otto Loewi, por lo que obtuvieron el premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1936. Es la única amina de bajo peso molecular clasificada como neurotransmisor que no es un aminoácido o derivada directamente de uno. Es utilizada por las neuronas motoras de la médula espinal y, por lo tanto, es liberada en todas las uniones neuromusculares de los vertebrados.

En el sistema nervioso autónomo, es el neurotransmisor para todas las neuronas preganglionares y para las neuronas posganglionares parasimpáticas. Está presente en muchas sinapsis en el cerebro; en particular los cuerpos celulares que sintetizan ACh son numerosos en el núcleo basal, que tiene muchas proyecciones a la corteza cerebral. Las fibras nerviosas que son capaces de sintetizar, almacenar y liberar ACh se denominan colinérgicas.

Las terminaciones nerviosas colinérgicas contienen gran número de pequeñas vesículas sinápticas concentradas cerca de la membrana celular. La llegada de un potencial de acción a la terminación nerviosa colinérgica origina la apertura rápida y transitoria de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Con entrada de este ion al interior celular se desencadena la fusión de la membrana de la vesícula con la membrana de la terminación nerviosa. En la unión neuromuscular, esta fusión origina la liberación de varios cientos de vesículas de ACh; en las terminaciones nerviosas posganglionares la cantidad de transmisor liberado por despolarización es probablemente menor.

Tras su liberación, la ACh difunde a través de la hendidura sináptica para unirse con los receptores específicos, denominados colinérgicos. Gran parte de esta ACh es hidrolizada en la hendidura por la acetilcolinesterasa a acetato y colina, la cual carece de actividad neurotransmisora o posee menor eficacia que ACh; por lo tanto, este proceso permite recuperar la capacidad de respuesta de la célula efectora ante la llegada de un nuevo impulso nervioso.

## RECEPTORES POSTSINÁPTICOS

Los receptores postsinápticos son proteínas integrales de la membrana plasmática que se activan por unión de un neurotransmisor específico, provocando una respuesta en la célula en cuya membrana están insertos. Existen dos grandes tipos de receptores: los receptores metabotrópicos y los receptores ionotrópicos.

Los receptores metabotrópicos, cuya estructura generalmente es de siete segmentos transmembrana, generan respuestas mediante la interacción con proteínas G.

Los receptores ionotrópicos son receptores que, en respuesta a la unión de su molécula ligando, sufren un cambio conformacional que provoca la apertura de un poro en su interior, lo que permite el pasaje de iones de un lado al otro de la membrana, por lo que son denominados canales iónicos activados por ligando (LGIC: *Ligand Gated Ion Channels*) (Kalamida *et al.*, 2007).

Existen tres superfamilias de subunidades de receptores activados por ligando (Le Novère y Changeux, 2001):

- Los canales activados por ATP (receptores ATP2x), formados por tres subunidades homólogas, cada una con dos segmentos transmembrana.
- Los canales catiónicos activados por glutamato (receptores NMDA, AMPA, kainato), formados por cuatro subunidades homólogas, cada una con tres segmentos transmembrana.
- Los receptores de la superfamilia de los canales pentaméricos activados por ligando (pLGICs, *pentameric Ligand Gated Ion Channels*), dentro de los cuales se encuentran los receptores *cys-loop* (receptores nicotínicos,

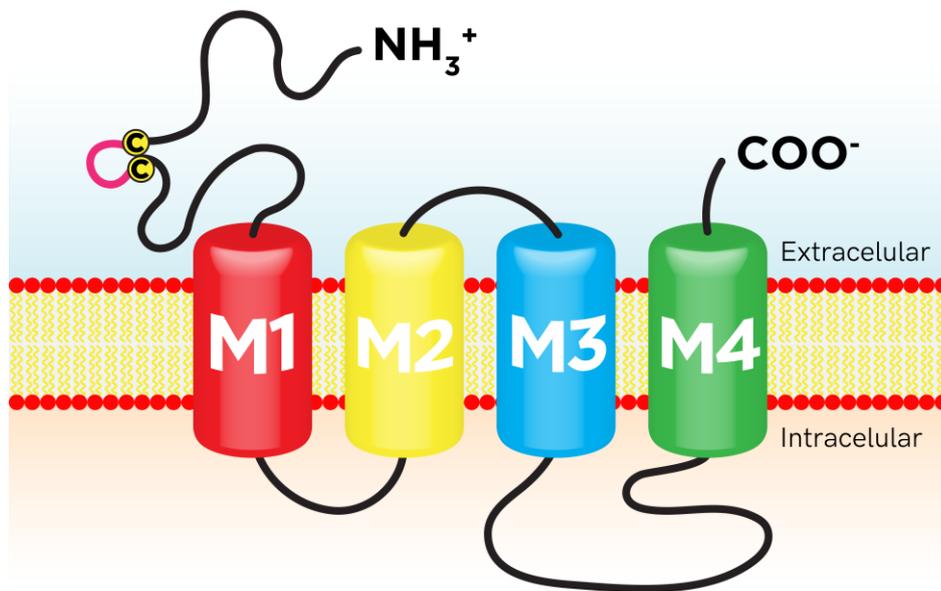
receptores de serotonina, receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub>, receptores de glicina y algunos de glutamato, histamina y canales aniónicos activados por serotonina), formados por cinco subunidades homólogas, cada una con cuatro segmentos transmembrana. Anteriormente, esta superfamilia incluía solo a los receptores *cys-loop*, pero recientemente canales iónicos procariotas activados por protones fueron asignados al grupo de los pLGICs dado que poseen una estructura pentamérica similar, a pesar de que carecen del *loop* de cisteína característico que se describe más adelante (Zhang *et al.*, 2013).

Los receptores a los que nos abocaremos en este trabajo de tesis pertenecen a la familia *cys-loop*.

## **Receptores *cys-loop***

Los receptores de la superfamilia *cys-loop* están compuestos por cinco subunidades homólogas. Cada subunidad (figura 3) contiene un dominio extracelular N-terminal, seguido de cuatro segmentos transmembrana. El *loop* localizado entre los segmentos transmembrana 3 y 4 (M3 y M4) compone el dominio intracelular, de longitud variable. Por último, luego del cuarto segmento transmembrana (M4) se encuentra el segmento C-terminal, que se localiza extracelularmente. La característica distintiva de las subunidades que le da el nombre a este grupo es la existencia en el dominio N-terminal de un puente disulfuro entre dos cisteínas separadas por 13 aminoácidos, formando el «*cys-loop*».

La función esencial de los receptores *cys-loop* es acoplar la unión del agonista a la apertura del canal iónico. Dado que este proceso gobierna la transmisión sináptica, la elucidación de su mecanismo y las estructuras involucradas han constituido un gran desafío de larga data (Connolly y Wafford, 2004; Sine y Engel, 2006; Bartos *et al.*, 2009; Miller y Smart, 2010; Thompson *et al.*, 2010; Bouzat, 2012).



**Figura 3** Estructura general de las subunidades de los receptores *cys-loop*. En magenta se destaca el *cys-loop*, estabilizado por un puente disulfuro formado entre cisteínas. Las cuatro hélices  $\alpha$  transmembrana (M1-M4) se destacan en distintos colores.

## Receptores de acetilcolina

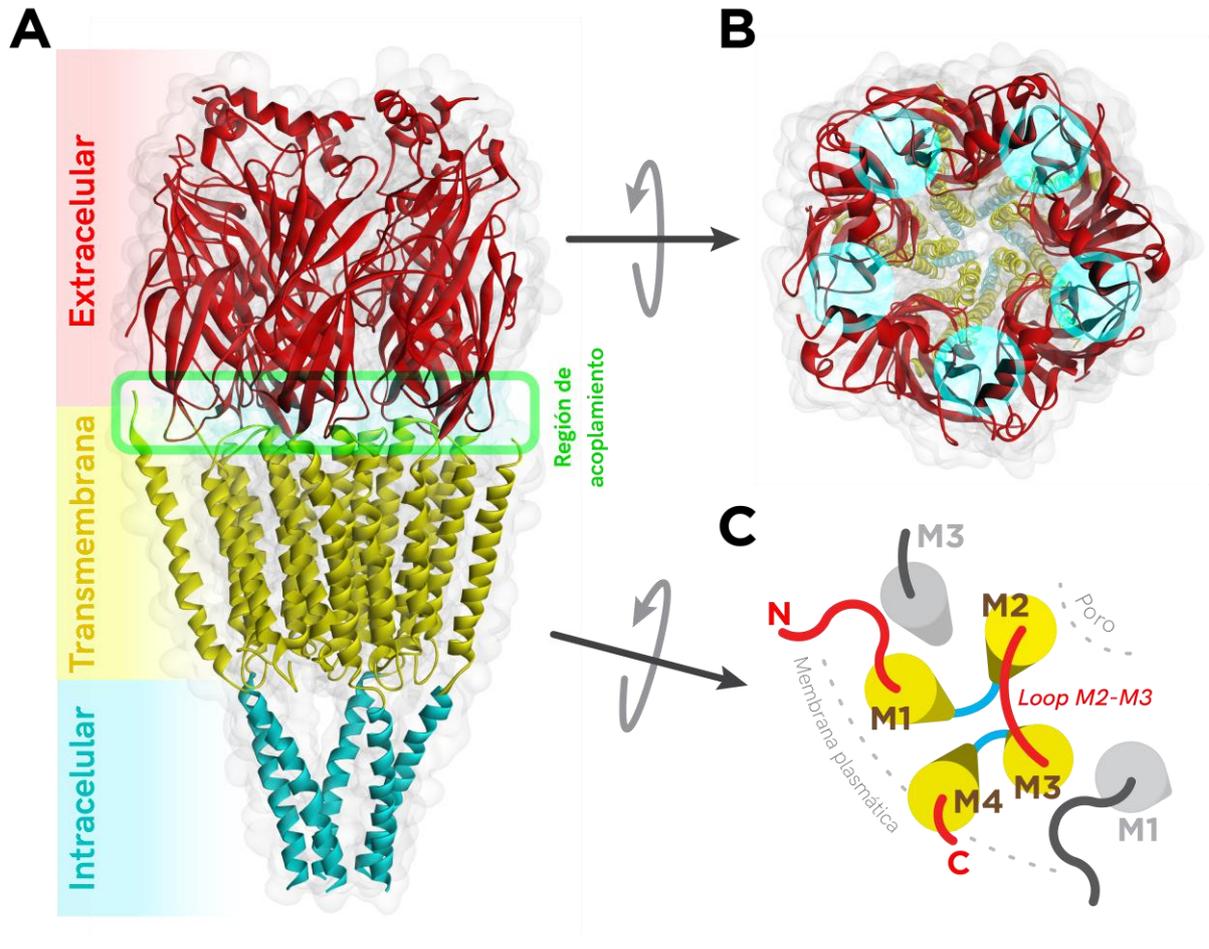
Los receptores de ACh se clasifican en dos grupos según su respuesta a dos moléculas: los receptores muscarínicos (mAChRs, *muscarinic acetylcholine receptors*), que responden a muscarina, y son miembros de la familia de receptores acoplados a proteína G (metabotrópicos); y los receptores nicotínicos (nAChRs, *nicotinic acetylcholine receptors*), que responden a nicotina, y son el prototipo de la superfamilia de los LGICs (ionotrópicos) y de la subfamilia de receptores *cys-loop*.

Los nAChRs se encuentran ampliamente distribuidos en el reino animal, desde nematodos hasta humanos. Pueden, a su vez, ser divididos en dos grupos: el tipo muscular y el neuronal. El nAChR muscular se encuentra en los órganos eléctricos de los peces como los del género *Torpedo*, en donde su abundancia permitió realizar los primeros estudios de composición y estructura del nAChR (Schmidt y Raftery, 1973); y en el músculo esquelético de los vertebrados, donde media la transmisión neuromuscular en la placa motora. El tipo neuronal se encuentra principalmente en el sistema nervioso central y periférico, aunque también está presente en tejidos no neuronales (Kalamida *et al.*, 2007). Los nAChRs en el cerebro representan una familia amplia y heterogénea de receptores expresados ubicuamente, cuyas respuestas a ACh y colina (Ch, *choline*) endógenas, y nicotina exógena, se encuentran involucradas en un número de procesos fisiológicos y efectos farmacológicos (Corradi y Bouzat, 2016).

### **Estructura general de los receptores *cys-loop***

Los receptores *cys-loop* están formados por cinco subunidades iguales (receptores homoméricos) o distintas (heteroméricos) organizadas alrededor de un poro central (figura 4A).

El dominio N-terminal extracelular, compuesto por láminas  $\beta$  formando un núcleo de sándwich  $\beta$ , conforma los sitios de unión de ligando que se localizan en la interfase entre subunidades adyacentes (figura 4B y figura 5). Varios *loops* que conectan láminas  $\beta$  contribuyen a la interfase con el dominio transmembrana, teniendo un rol importante en el acoplamiento de los eventos de unión del ligando



**Figura 4** A. Modelo tridimensional del receptor muscular de acetilcolina de *Torpedo marmorata*. Se muestra en rojo el dominio extracelular, en amarillo el dominio transmembrana y en cian el dominio intracelular. En el recuadro verde se destaca la región de acoplamiento, entre los dominios extracelular y transmembrana. B. Vista superior del receptor, destacando las interfaces entre subunidades en las que pueden encontrarse sitios de unión al agonista. C. Esquema de la vista superior del receptor inserto en membrana, destacándose las hélices transmembrana M1-M4.

a los de apertura del canal (Bouzat *et al.*, 2004; Absalom *et al.*, 2009).

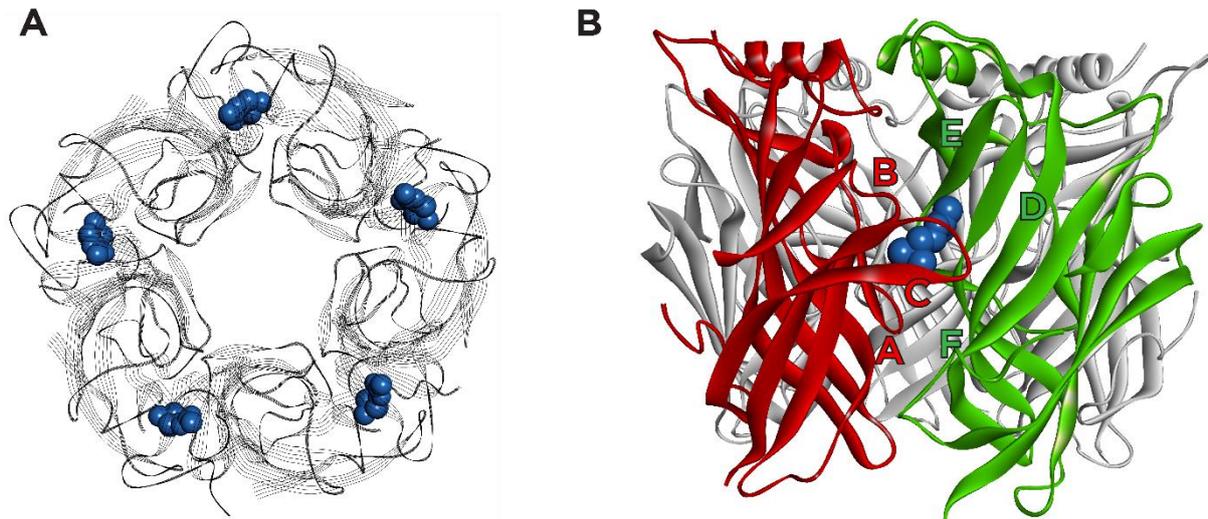
La porción transmembrana de cada subunidad está compuesta de cuatro segmentos de hélice  $\alpha$ , M1-M4, y los *loops* funcionalmente importantes M1-M2 (del lado intracelular) y M2-M3 (del lado extracelular, figura 4C). Esta porción está unida covalentemente al dominio extracelular al final de la hélice M1, y también interactúa, a través del *loop* M2-M3, con los *loops*  $\beta$ 1- $\beta$ 2 y *cys* de la porción extracelular (Bertrand *et al.*, 2008).

La porción intracelular está compuesta principalmente por el tramo de secuencia entre M3 y M4. (Unwin, 2005). En esta región se encuentran residuos de importancia para la conductancia del canal (Kelley *et al.*, 2003; Rayes *et al.*, 2009; Andersen *et al.*, 2013).

## **Dominio extracelular**

La cristalización a alta resolución de la estructura de la proteína unidora de ACh (AChBP, *acetylcholine-binding protein*, figura 5) del caracol *Lymnaea stagnalis* profundizó el conocimiento sobre la estructura del dominio extracelular de los nAChRs (Brejc *et al.*, 2001). Es una proteína soluble producida y almacenada por el molusco en células gliales, y liberada en forma dependiente de concentración de ACh en la hendidura sináptica, donde modula la transmisión sináptica.

La AChBP madura posee 210 residuos de longitud, y forma un homopentámero. A pesar de que carece de los segmentos transmembrana e intracelular, contiene muchos de los elementos que les dan a los nAChRs sus propiedades únicas, por lo que se convirtió en un modelo estructural y funcional del dominio extracelular de los receptores *cys-loop*. Cada monómero de la AChBP consiste en una hélice  $\alpha$  N-terminal, dos hélices  $\beta_{10}$  cortas, y un núcleo de 10 cadenas  $\beta$  que forman una estructura en sándwich  $\beta$ . La lámina  $\beta$  interna está formada por  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_5$ ,  $\beta_6$  y  $\beta_8$ , y la externa por  $\beta_4$ ,  $\beta_7$ ,  $\beta_9$  y  $\beta_{10}$ . Los segmentos N y C-terminales se localizan en la parte superior e inferior del pentámero, respectivamente. El segmento de unión entre  $\beta_6$  y  $\beta_7$  localizado en la parte inferior de la subunidad constituye el *cys-loop* característico que está en todos los



**Figura 5** A. Vista superior de la proteína unidora de acetilcolina (AChBP) de *Lymnaea stagnalis* (líneas negras) con cinco moléculas de acetilcolina (azul) ubicadas en los sitios de unión. B. Detalle del sitio de unión del agonista, formado por los *loops* A-F en la interfase entre las subunidades.

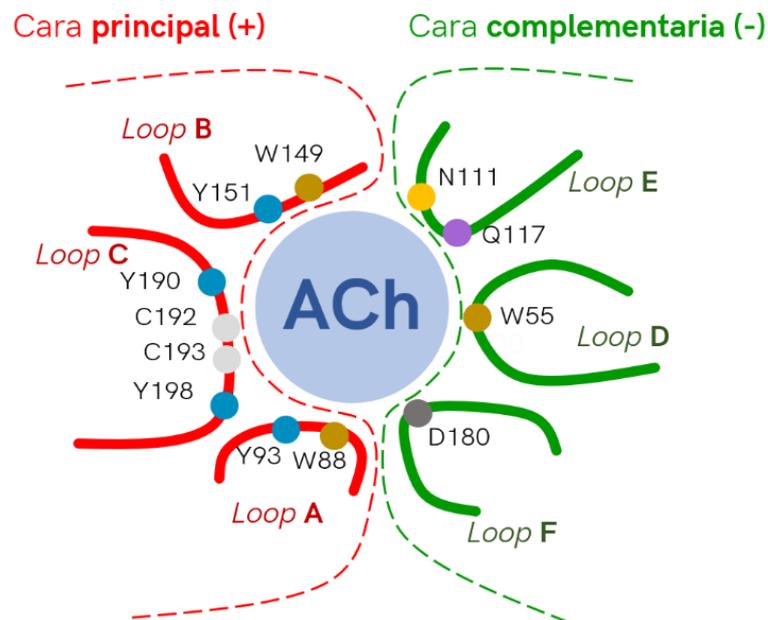
miembros de la superfamilia (Bouzat, 2012).

### Sitio de unión del agonista

En los nAChRs, el sitio de unión del agonista se encuentra localizado en la porción extracelular, en la interfase entre subunidades, formado por 6 *loops* distribuidos en dos «caras» (figura 5B y figura 6). La cara principal o «+» está formada por aminoácidos de una subunidad de tipo  $\alpha$ , la que contribuye al sitio de unión con los *loops* A (que corresponde al *loop* 8485), B (*loop* 8788) y C (*loop* 89810). La cara complementaria o «-», está formada por aminoácidos de la subunidad adyacente, sea esta  $\alpha$  o no  $\alpha$ , la que aporta los *loops* D, E y F.

Los *loops* antes mencionados agrupan residuos que son de importancia para la unión de ACh. Para el caso de la cara principal, en el *loop* A se encuentran W86 e Y93; en el *loop* B, W149 y G153; y en el *loop* C, Y190, C192, C193 e Y198. Por

otra parte, en la cara complementaria, en el *loop* D, W55 y D57; en el *loop* E, L109, R111, T117 y L119; y F, D174 y E176 (Figura 6).

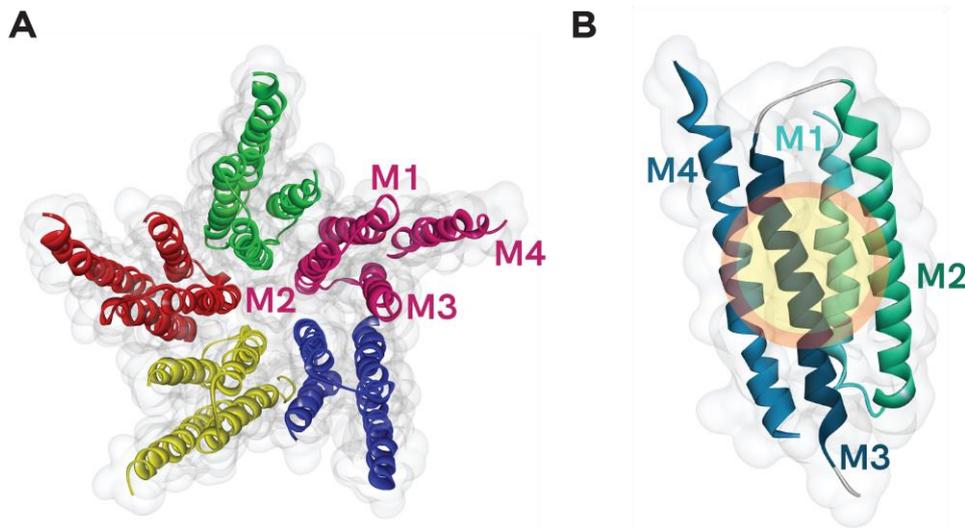


**Figura 6** Esquema de los distintos *loops* que forman parte del sitio de unión del agonista (A-F) y su contribución a las caras principal (+) y complementaria (-) del mismo. Se destacan aminoácidos de importancia en cada *loop*.

Solo las subunidades  $\alpha$  son capaces de aportar los residuos necesarios para formar tanto la cara principal como la complementaria; el resto de las subunidades únicamente aporta la cara complementaria. Por ello, los receptores heteropentaméricos son funcionales únicamente si poseen al menos una subunidad  $\alpha$ . Por ejemplo, el nAChR muscular, de estequiometría  $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ , contiene dos sitios diferentes de unión al ligando ( $\alpha 1\delta$  y  $\alpha 1\gamma$ ); mientras que el receptor homopentamérico  $\alpha 7$  contiene cinco, idénticos (Brejc *et al.*, 2001; Bouzat, 2012).

## Dominio transmembrana

El dominio transmembrana de las subunidades de los nAChRs está formado por



**Figura 7** A. Vista superior del modelo tridimensional de las 4 hélices transmembrana M1-M4 de cada subunidad de receptor, mostrando que los segmentos M2 forman el poro y el resto de los segmentos son más externos al mismo. B. Detalle de las hélices transmembrana destacando el sitio de unión de algunos moduladores alostéricos positivos formado entre ellas.

cuatro hélices alfa, M1-M4, las que se orientan de manera que las cinco hélices M2 de las distintas subunidades del pentámero forman el poro iónico (figura 7). El resto de las hélices (M1, M3 y M4) se ubican más externamente, formando un escudo que separa al poro de los lípidos de la membrana plasmática (Bouzat 2012). Las hélices M2 internas que recubren el poro se inclinan radialmente hacia el eje central del receptor hasta alcanzar el centro de la membrana, produciendo una estructura en «V» o embudo, que se ensancha desde la membrana hacia el extremo extracelular (Absalom *et al.*, 2009; Morales-perez *et al.*, 2016).

Cada hélice M2 de cada subunidad posee grupos de residuos homólogos (o idénticos en el caso de los receptores homopentaméricos) que forman anillos de distintos ambientes químicos sobre la superficie del poro. Estos anillos son predominantemente no polares, y presentarían una superficie relativamente inerte para los iones que difunden, pero algunos contienen grupos negativamente cargados, los que influyen el transporte cuando el poro está abierto mediante el

aumento de la concentración local de cationes y la disminución de la de aniones (Miyazawa *et al.*, 2003).

En el centro de la membrana, el poro posee un área de máxima constricción denominada «compuerta», en la que los anillos están formados por residuos hidrofóbicos (Miyazawa *et al.*, 2003; Unwin, 2005; Bouzat, 2012). El consenso para el diámetro del poro en esta zona en el estado cerrado de los receptores *cys-loop* es de aproximadamente 6 a 8 Å, por lo que la barrera para el paso de iones no está dada por oclusión, sino que existe una barrera energética hidrofóbica a la permeación de iones (Absalom *et al.*, 2009; Morales-perez *et al.*, 2016). Imágenes de microscopía electrónica del poro del nAChR a una resolución de 4 Å revelan que el canal comprende un anillo de cinco hélices  $\alpha$  alineadas verticalmente, cada una de las cuales aportada por cada subunidad. Las hélices no son perfectamente paralelas; las porciones extracelulares de cada hélice se alejan entre sí, provocando que el canal sea de mayor diámetro en el extremo externo, dejando a cada hélice con un estrechamiento en el centro (Miyazawa *et al.*, 2003; Miller y Smart, 2010).

La unión del agonista al sitio de unión extracelular provoca cambios conformacionales en dicho sitio, que se transmiten a través de la estructura proteica del receptor mediante interacciones entre distintos *loops* hasta la compuerta. Se han propuesto distintos tipos de movimientos asociados a su apertura (rotación de las hélices M2 completas, inclinación de las hélices M2, reordenación sutil de los segmentos transmembrana). El movimiento fundamental que causa la eliminación transitoria de la barrera al flujo iónico es un área importante de estudio en la actualidad (Bouzat, 2012).

## Dominio intracelular

La porción intracelular está compuesta principalmente por el tramo de secuencia entre las hélices M3 y M4, e incluye una hélice anfipática, MA, que precede a M4 (Unwin, 2005). Juntas, las hélices MA intracelulares de cada subunidad crean un cono pentagonal invertido que tiene cinco espacios abiertos denominados «ventanas». Estas son vías iónicas obligatorias, ya que no existen rutas alternativas para el transporte hacia o desde el vestíbulo intracelular. Las ventanas tienen un ancho máximo de solo 8 Å, comparable al diámetro de un ion de sodio o potasio rodeado por su primera capa de hidratación (Unwin, 2005).

Esta región posee gran importancia en la conductancia de los receptores *cys-loop*. Por ejemplo, el receptor monomérico de serotonina formado por subunidades 5-HT<sub>3A</sub> posee una conductancia de 0,4 pS, mientras el heteromérico, formado por subunidades 5-HT<sub>3A</sub> y B posee 16 pS. En 2003, Kelley y colaboradores concluyeron que esta diferencia se debe a tres residuos arginina presentes en el dominio intracelular de las subunidades 5-HT<sub>3A</sub>, ya que al ser mutados a los presentes en la subunidad 5-HT<sub>3B</sub> aumentaron la conductancia de los homopentámeros 5-HT<sub>3A</sub> 28 veces (Kelley *et al.*, 2003).

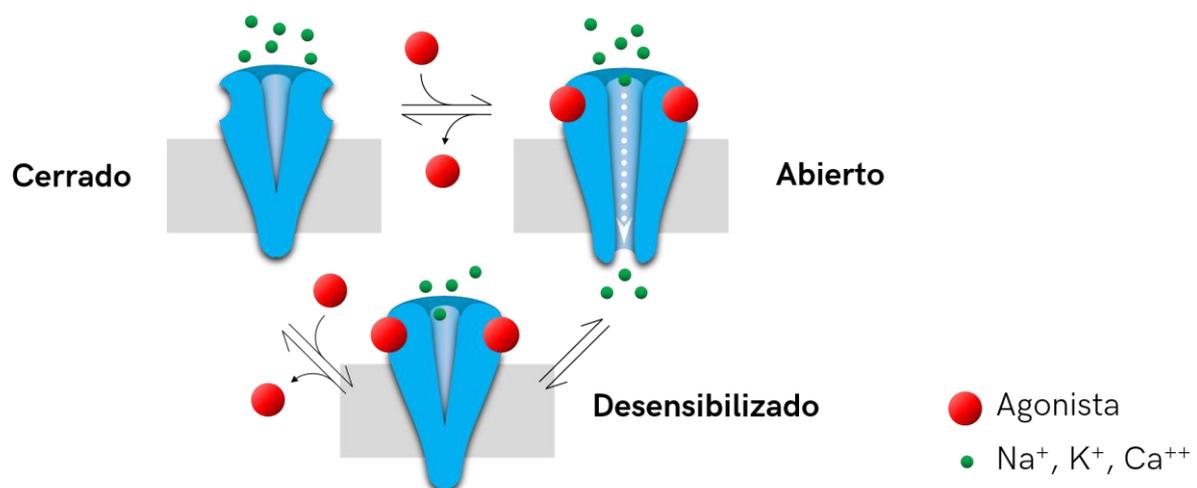
Las distintas subunidades de receptores *cys-loop* poseen residuos homólogos clave que determinan su conductancia, y la realización de mutaciones que permiten intercambiar estos residuos para dar origen a subunidades de baja o alta conductancia es la base fundamental de la estrategia «*Electrical fingerprinting*», desarrollada en nuestro laboratorio y utilizada en esta tesis (Bouzat *et al.*, 2008; Rayes *et al.*, 2009; Andersen *et al.*, 2011, 2013; Lasala *et al.*, 2018; Nielsen *et al.*, 2018). La misma será descrita más adelante.

## Cambios conformacionales y respuesta de los receptores *cys-loop*

En base del modelo Monod-Wyman-Changeux, la respuesta funcional de un pLGIC puede ser interpretada como una selección de unas pocas conformaciones discretas, provocadas por la unión del agonista: cerrado, abierto y desensibilizado (Monod *et al.*, 1965, figura 8).

Los receptores *cys-loop* en estado cerrado se abren de manera transitoria luego de la unión de agonista. En la presencia continua del agonista, se vuelven refractarios al estímulo y la respuesta de la célula disminuye. Este proceso se denomina desensibilización, en el cual los iones no pueden atravesar el poro del canal, a pesar de que el receptor posee alta afinidad por el agonista (Zhang *et al.*, 2013).

Se han propuesto estados intermedios entre estos estados para los nAChRs y varios pLGICs. Estudios cinéticos han revelado que la unión del agonista al receptor y el proceso conocido como «gatillado» se encuentran acoplados y se



**Figura 8** Esquema básico de activación y desensibilización de los pLGICs. Los estados de reposo, abierto y desensibilizado pueden ser positiva o negativamente modulados por compuestos alostéricos (Bouzat y Sine, 2018).

influyen el uno al otro, pero este acoplamiento no es un único simple paso a través de un cuerpo proteico rígido. En cambio, la activación del canal involucra la unión del agonista, cambios conformacionales secuenciales, y por último el gatillado (Chang *et al.*, 2009). El número de estados en las conformaciones principales y la velocidad de transición entre estados determina la cinética del receptor, siendo lo que ajusta cada receptor a su rol fisiológico. Por ello, drogas que se unan a distintos estados pueden modular de manera distinta la función del receptor (Corradi y Bouzat, 2016).

## **Activación**

El acoplamiento de la unión del agonista con la apertura de canal requiere cambios estructurales coordinados entre múltiples *loops* en la interfase entre los dominios extracelular e intracelular (Bouzat *et al.*, 2008). Se ha propuesto este mecanismo como una onda conformacional que viaja desde el sitio de unión del agonista hacia la compuerta del canal mediante movimientos finos de varios dominios extracelulares de la subunidad y el sitio de binding del agonista (Miller y Smart, 2010; Criado *et al.*, 2011).

El primer paso para la activación es la unión del agonista, lo que provoca una reorganización del sitio de unión, requerida para transmitir la información río abajo. Este cambio se ha resuelto en AChBPs involucrando un movimiento de «atrapamiento» (*capping*) del *loop C* que cierra la cavidad del sitio de unión, atrapando las moléculas de agonista.

El *loop C* se encuentra conectado covalentemente por medio de la hoja  $\beta 10$

al segmento transmembrana M1, por lo que los cambios se traducen hacia la interfase entre los dominios extracelular y transmembrana del canal. Por otra parte, el acoplamiento de la unión del agonista con la apertura del canal requiere cambios estructurales coordinados a través de múltiples *loops* compatibles presentes en dicha interfase, conocida como «región de acoplamiento» (*coupling region*) (Bouzat *et al.*, 2004, 2008; Zhang *et al.*, 2013). A través de interacciones principalmente hidrofóbicas y electrostáticas en esta red de *loops*, la energía de la unión del agonista puede ser transducida hacia la energía requerida para el gatillado (Chang *et al.*, 2009; Miller y Smart, 2010). Además, esta zona de la proteína gobierna el tiempo en el que el canal se mantiene abierto y la velocidad de desensibilización (Bouzat *et al.*, 2008).

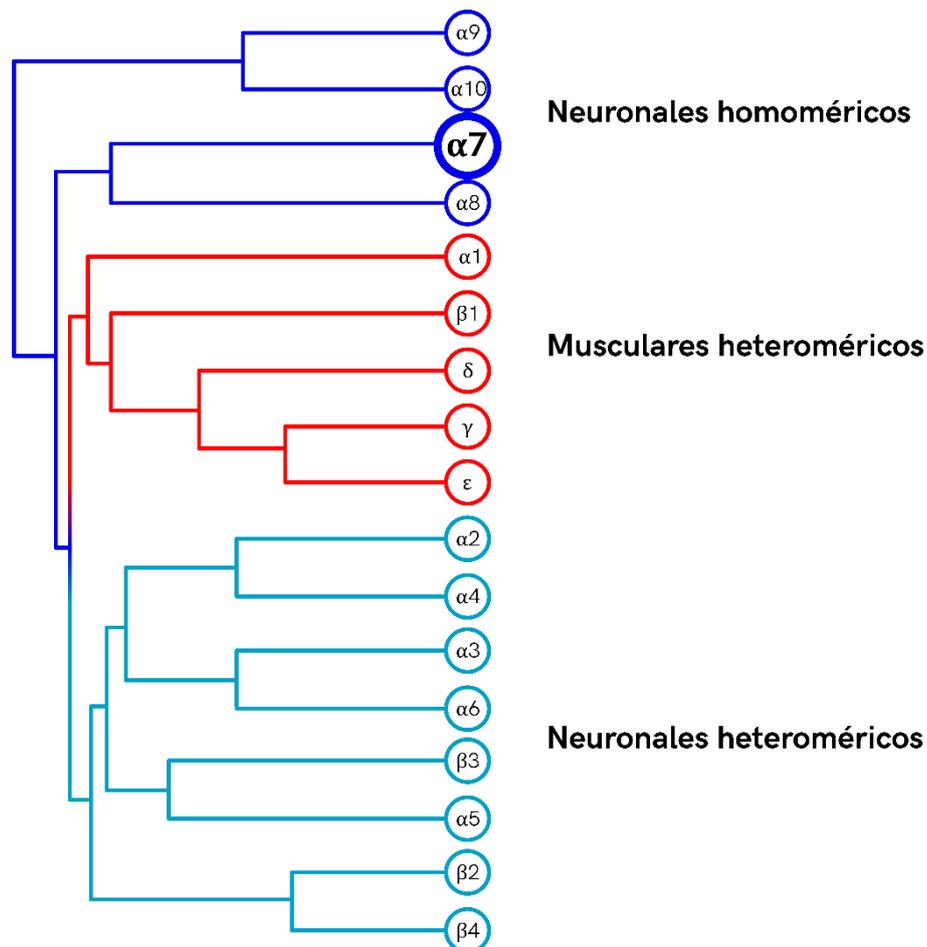
El paso final en el proceso de activación involucra la apertura de la compuerta, lo que permite el flujo selectivo de iones a través de la membrana superando uno o más filtros de selectividad. Originalmente se pensaba este evento como una rotación lateral de las hélices M2, haciendo girar los estrechamientos de los anillos hidrofóbicos hacia afuera (Unwin, 2005). Actualmente se propone que la compuerta se abre gracias a un movimiento de inclinación de las hélices (Paas *et al.*, 2005; Miller y Smart, 2010).

## **RECEPTOR NICOTÍNICO $\alpha 7$**

Existen en vertebrados 17 subunidades de nAChRs distintas que se combinan para formar receptores con diferente localización, función y farmacología (figura 10, Le Novère *et al.*, 2002).

El receptor nicotínico homopentamérico  $\alpha 7$  es uno de los nAChRs más abundantes en el sistema nervioso central. Se encuentra expresado principalmente en regiones importantes para la función cognitiva y la memoria tales como hipocampo, corteza y regiones límbicas subcorticales (Lendvai *et al.*, 2013), donde contribuye a la cognición, el procesamiento sensorial de la información, la atención, la memoria de trabajo y vías de recompensa (Corradi y Bouzat, 2016).

En neuronas,  $\alpha 7$  se localiza presinápticamente en terminales GABAérgicas y glutamatérgicas en el hipocampo y otras regiones para facilitar la liberación de



**Figura 10** Cladograma de las subunidades de nAChRs de vertebrados. Adaptado de Le Novère *et al.*, 2002.

neurotransmisores, modulando los niveles de calcio intracelular en áreas de los cuerpos celulares, dendritas y botones terminales (Broide y Leslie, 1999).  $\alpha 7$  es también capaz de modular la liberación de otros neurotransmisores además de GABA, incluyendo glutamato, dopamina y norepinefrina, por lo que posee el potencial de participar en un rango amplio de funciones neurológicas (Hurst *et al.*, 2005).

Postsinápticamente,  $\alpha 7$  posibilita la transmisión sináptica rápida, y en localizaciones perisinápticas modula la excitabilidad neuronal, pudiendo potenciar las respuestas de receptores no  $\alpha 7$  (Lendvai *et al.*, 2013), y activando una variedad de mecanismos de señalización a través de la transmisión en volumen (Jones y Wonnacott, 2004). La activación de  $\alpha 7$  no solo potencia la transmisión sináptica sino que prolonga las respuestas adaptativas, dado que afecta a la potenciación a largo plazo (Lendvai *et al.*, 2013).

Por otra parte, la expresión de  $\alpha 7$  es beneficiosa para el sistema nervioso, dado que una activación moderada de estos receptores incrementa la resistencia celular al daño cerebral, lo que ha sido demostrado en experimentos *in vivo* y modelos *ex vivo* de demencias, isquemia cerebral y daño cerebral traumático. (Lendvai *et al.*, 2013).

Su presencia no se limita solo al sistema nervioso, ya que también se lo halla en otros tejidos tales como células sanguíneas, células epiteliales, endoteliales, fibroblastos, células del sistema digestivo y respiratorio, espermatozoides y células de Sertoli (Corradi y Bouzat, 2016). Además, en células del sistema inmune cumple un rol fundamental en la vía antiinflamatoria colinérgica y se encuentra en

microglía, linfocitos T y B, células NK y macrófagos (Wang *et al.*, 2003; Costantini *et al.*, 2015). Incluso existe en cerebro una vía colinérgica que regula la activación de la microglía a través de  $\alpha 7$ , la cual podría ser importante en la enfermedad de Parkinson (Stuckenholz *et al.*, 2013).

Dentro del grupo de los nAChRs, el subtipo  $\alpha 7$  posee características distintivas tales como su alta permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  (Séguéla *et al.*, 1993), su afinidad por la toxina de serpiente  $\alpha$ -Bungarotoxina ( $\alpha$ -Btx) y el alcaloide vegetal metilcaconitina (Couturier *et al.*, 1990; Palma *et al.*, 1996) y una baja probabilidad de apertura sumada a una rápida velocidad de desensibilización (Lendvai *et al.*, 2013). La alta permeabilidad de  $\alpha 7$  al  $\text{Ca}^{2+}$  podría provenir del arreglo de los residuos cargados en la parte más profunda del poro iónico, y de los residuos polares presentes en la parte más externa del canal (Galzi *et al.*, 1992; Colón-Sáez y Yakel, 2014).

En presencia de ACh,  $\alpha 7$  se activa predominantemente en episodios breves únicos, separados por cierres largos. Menos frecuentemente, estas aperturas aparecen agrupadas en *bursts*, los cuales son conjuntos de dos o más aperturas ocasionadas por una misma molécula de receptor. Este patrón temporal no se ve afectado por concentraciones bajas o altas de ACh (Bouzat *et al.*, 2008). Esta falta de dependencia de concentración en conjunto con el hecho de que la mayoría de los episodios de activación consisten en una apertura simple con una duración similar a la de la constante de desensibilización indican que el principal mecanismo por el cual el canal se cierra es la desensibilización. Esta es una característica única entre los distintos nAChRs. La rápida desensibilización y corta duración de los eventos de apertura podrían evitar la toxicidad celular debida a un incremento en

el Ca<sup>2+</sup> intracelular por una sobreestimulación de  $\alpha 7$  (Corradi y Bouzat, 2016).

Por otra parte, se ha reportado la existencia de acciones metabotrópicas de  $\alpha 7$ , independientes de su acción como canal. Por ejemplo, es capaz de interactuar con complejos de proteínas G para regular el crecimiento de neuritas y axones, pudiendo tener implicancias en el desarrollo del cerebro (Nordman y Kabbani, 2012). También se ha propuesto un rol en la inmunomodulación a través del nervio vago, el cual estaría modulado por la activación del complejo NF- $\kappa$ B y la vía Jak/STAT (De Jonge y Ulloa, 2007).

En la enfermedad de Alzheimer existe una reducción significativa de  $\alpha 7$  en el cerebro, particularmente en el hipocampo (Guan *et al.*, 2000; Kadir *et al.*, 2006), como también en pacientes con esquizofrenia (Schaaf, 2014; Dineley *et al.*, 2015). El gen que codifica para la subunidad  $\alpha 7$ , *CHRNA7*, se encuentra en una región del cromosoma 15 genéticamente ligada a múltiples desórdenes con déficits cognitivos como esquizofrenia, discapacidad intelectual, desorden bipolar, desórdenes del espectro autista, déficit de atención con hiperactividad, epilepsia, enfermedad de Alzheimer y déficits en el procesamiento sensorial (Sinkus *et al.*, 2009; Schaaf, 2014; Dineley *et al.*, 2015; Deutsch *et al.*, 2016). Una duplicación parcial de *CHRNA7* que da como resultado el gen quimérico *CHRFAM7A*, presente solo en humanos, se asocia con esquizofrenia (Sinkus *et al.*, 2009, 2015; Neri *et al.*, 2012). El producto de este gen, dup $\alpha 7$ , carece de parte del sitio de unión al agonista y podría actuar como un modulador negativo de  $\alpha 7$  (Wang *et al.*, 2014; Lasala *et al.*, 2018).

Por todo lo expuesto, se puede asegurar que las propiedades únicas de

activación, la alta permeabilidad al calcio, la acción dual ionotrópica y metabotrópica, la distribución ubicua, y el rol en variedad de enfermedades neurológicas, psiquiátricas e inflamatorias han transformado a  $\alpha 7$  en un blanco farmacológico emergente muy importante (Corradi y Bouzat, 2016). Los estudios sobre plasticidad neuronal *in vitro* y sobre efectos cognitivos *in vivo* soportan la idea de que la potenciación de  $\alpha 7$  podría resultar una forma efectiva de terapia contra la declinación cognitiva (Lendvai *et al.*, 2013).

## **MODULADORES ALOSTÉRICOS POSITIVOS Y AGONISTAS ALOSTÉRICOS DE $\alpha 7$**

Tradicionalmente, las estrategias terapéuticas más comunes para corregir los déficits colinérgicos han incluido el aumento de la síntesis de ACh, la estimulación de los receptores colinérgicos o la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa. Sin embargo, el incremento en la síntesis de ACh ha mostrado poca eficacia, la utilización de agonistas colinérgicos induce desensibilización de los receptores, llevando a tolerancia y por lo tanto pérdida de los efectos beneficiosos, y la inhibición de la acetilcolinesterasa produce mejoras de los síntomas de corta duración, que no impiden la progresión de la enfermedad (Maelicke y Albuquerque, 2000).

Una de las nuevas estrategias terapéuticas para mejorar la función colinérgica es la utilización de moduladores alostéricos positivos (PAMs, *positive allosteric modulators*). Los PAMs son compuestos cuyo sitio de unión al receptor (sitio alostérico) es distinto al de unión al agonista (sitio ortostérico). Producen la potenciación de la respuesta del receptor a su agonista ortostérico, pero tienen

muy escaso o nulo efecto por sí solos (Maelicke y Albuquerque, 2000; Hurst *et al.*, 2005; Timmermann *et al.*, 2007; Andersen *et al.*, 2016; Corradi y Bouzat, 2016). También existen los moduladores alostéricos negativos, que tienen efectos inhibitorios sobre el canal (Taly *et al.*, 2009; Bouzat *et al.*, 2018).

La potencial utilización de PAMs como estrategia terapéutica traería consigo diferentes ventajas. En primer lugar, como no son capaces de activar por sí solos a los receptores nicotínicos sino que aumentan la potencia o eficacia de la activación por agonistas endógenos, los que son liberados naturalmente según las necesidades, mantienen las características temporales y espaciales de la activación endógena. En segundo lugar, los sitios alostéricos son menos conservados evolutivamente que los sitios ortostéricos entre los distintos nAChRs, lo que permite mayor selectividad a la hora de emplear compuestos sintéticos que la que ofrecen los sitios ortostéricos. Por otra parte, permiten mayor diversidad en la estructura y efectos finales a causa de la existencia de distintos sitios alostéricos dentro de un mismo receptor. Además, la activación de los receptores nicotínicos se ve disminuida a causa de la desensibilización de  $\alpha 7$ , por lo que aquellos PAMs que actúen sobre dicho proceso reducirían la tolerancia, haciendo más eficaces los tratamientos con agonistas. Por último, evitan la sobreestimulación de los receptores y actúan como protectores neuronales (Maelicke y Albuquerque, 2000; Uteshev, 2014; Chatzidaki y Millar, 2015; Corradi y Bouzat, 2016; Bouzat *et al.*, 2018).

Es probable que exista una variedad de distintos sitios alostéricos de unión en los nAChRs (Taly *et al.*, 2009). Uno de los más importantes está localizado en una cavidad intrasubunidad formada por cinco aminoácidos entre las cuatro

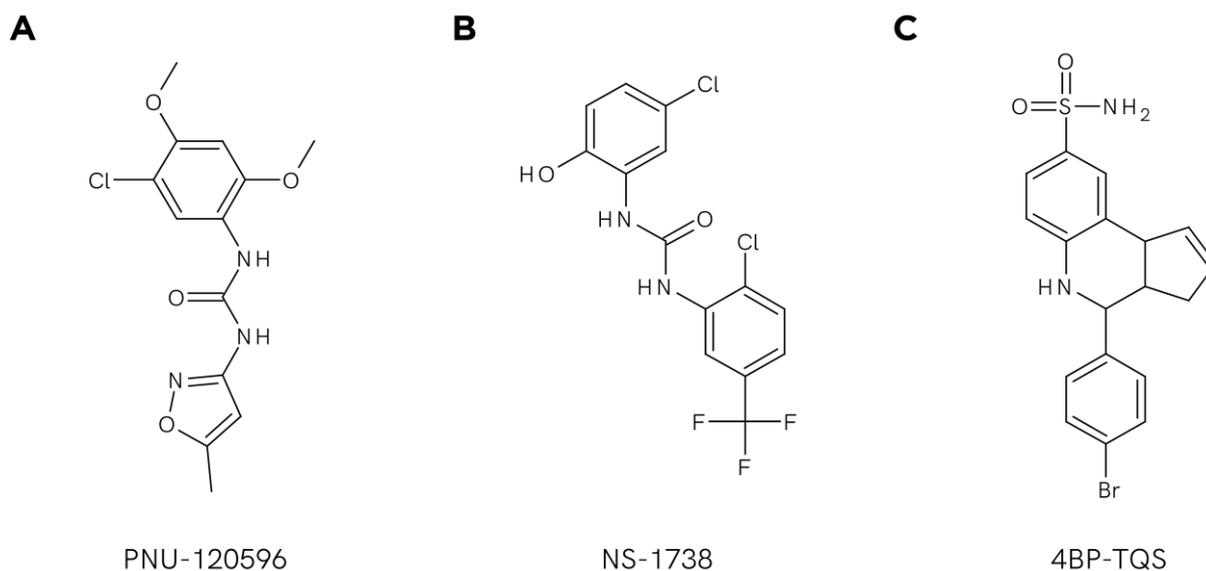
hélices  $\alpha$  transmembrana de cada subunidad  $\alpha 7$ , y es considerado un sitio modulador de receptores *cys-loop* altamente conservado (Gareth T. Young *et al.*, 2008; daCosta *et al.*, 2011; Gill *et al.*, 2011; Palczynska *et al.*, 2012; Corradi y Bouzat, 2016, figura 7B).

Los PAMs se clasifican en dos grupos de acuerdo con los efectos macroscópicos que ejercen sobre  $\alpha 7$ . Los de tipo I actúan incrementando los picos de corriente sin afectar significativamente el decaimiento de estas; mientras que los de tipo II reducen la desensibilización de  $\alpha 7$ , aumentando el pico de corriente como así también el tiempo de decaimiento. Además, al ser aplicados a receptores  $\alpha 7$  desensibilizados, los PAMs de tipo II pero no los de tipo I recuperan a los receptores de la desensibilización (Andersen *et al.*, 2016; Corradi y Bouzat, 2016; Bouzat *et al.*, 2018).

Además de actuar como potenciadores, algunos PAMs también son capaces de activar a los receptores. En 2011, Gill y colaboradores demostraron que ciertos compuestos que actúan en un sitio distinto al ortostérico clásico tienen la capacidad de activar  $\alpha 7$  en ausencia de agonistas convencionales, por lo que se los denominó agonistas alostéricos (Gill *et al.*, 2011). Los mismos se unen a la cavidad intrasubunidad de la región transmembrana descrita anteriormente.

En el desarrollo de esta tesis se han empleado PAMs de  $\alpha 7$  y un agonista alostérico, que se detallan a continuación. Además, se evaluó el papel del ion  $\text{Ca}^{2+}$  como PAM de  $\alpha 7$ .

El compuesto PNU-120596 (1-(5-cloro-2,4-dimetoxi-fenil)-3-(5-metil-



**Figura 11** A. Estructura química del PAM de tipo II PNU-120596. B. Estructura química del PAM de tipo I NS-1738. C. Estructura química del agonista alostérico 4BP-TQS.

isoxazol-3-il)-urea, figura 11A) es un PAM considerado el más eficaz descubierto hasta la fecha (Corradi y Bouzat, 2016). A nivel de corrientes macroscópicas la preincubación con PNU-120596 de células que expresan  $\alpha 7$  produce, al aplicar ACh, un incremento del pico de corriente y también un aumento en el tiempo de decaimiento originado por una disminución en la velocidad de desensibilización. Estas características lo han clasificado como PAM de tipo II (Hurst *et al.*, 2005; Grønlien *et al.*, 2007; daCosta *et al.*, 2011; Andersen *et al.*, 2016). El sitio de unión al receptor  $\alpha 7$  del PNU-120596 es probablemente la cavidad formada entre las cuatro hélices transmembrana M1-M4 antes mencionada (Cacucci *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2008; daCosta *et al.*, 2011).

El compuesto NS-1738 (1-(5-cloro-2-hidroxi-fenil)-3-(2-cloro-5-trifluorometil-fenil) -urea, figura 11B) es un PAM que aumenta la actividad del receptor  $\alpha 7$  provocada por ACh al ser utilizado en el rango micromolar bajo, con excelente selectividad contra otros subtipos de nAChRs. Aunque aumenta en gran medida

la magnitud de las corrientes macroscópicas de  $\alpha 7$ , no tiene efecto sobre la rápida desensibilización del receptor, por lo que se clasifica entonces como PAM de tipo I (Timmermann *et al.*, 2007). A nivel de canal único, se observa que las aperturas de  $\alpha 7$  en presencia de ACh y NS-1738 se agrupan en *bursts*, sin formar *clusters* como ocurre en el caso de la aplicación de PNU-120596 (Timmermann *et al.*, 2007; Andersen *et al.*, 2016). Se ha reportado que el dominio M2-M3 estaría involucrado en la potenciación por este PAM, aunque el sitio de unión no ha sido por el momento determinado (Grønlien *et al.*, 2007).

El compuesto 4BP-TQS (4-(4-bromofenil)-3a,4,5,9b-tetrahidro-3H-ciclopenta[c]quinolina-8-sulfonamida, figura 11C) es miembro de una familia de compuestos derivados de un PAM de  $\alpha 7$  de tipo II, el TQS (Grønlien *et al.*, 2007). Pequeñas modificaciones en la estructura del TQS (principalmente, adiciones de halógenos en un anillo bencénico) cambian las propiedades del compuesto, dándole incluso la capacidad de generar la activación del receptor sin necesidad de la aplicación conjunta de un agonista clásico (Gill *et al.*, 2011, 2012, 2013). Estos derivados se clasifican entonces como los anteriormente citados agonistas alostéricos. En el caso del 4BP-TQS, la aplicación de 10-50  $\mu\text{M}$  produce la activación del receptor en *bursts* y *clusters*, con una cinética similar a la de la coaplicación de ACh 100  $\mu\text{M}$  y PNU-120596 1-3  $\mu\text{M}$  (Palczynska *et al.*, 2012; Lasala *et al.*, 2018). Además de su acción como agonista alostérico, el 4BP-TQS también actúa como PAM, ya que la coaplicación con ACh aumenta la duración de los *bursts* (Palczynska *et al.*, 2012). El 4BP-TQS (y el resto de los derivados del TQS) poseería el mismo sitio de unión que PNU-120596, la cavidad transmembrana intrasubunidad (Gill *et al.*, 2011, 2013).

# METODOLOGÍA



## EXPRESIÓN DE SUBUNIDADES DE RECEPTOR EN SISTEMA HETERÓLOGO

### Subunidades de receptor utilizadas

#### Subunidad $\alpha 7$

El ADN complementario (ADNc) de la subunidad del receptor  $\alpha 7$  humano se subclonó en el vector de expresión basado en citomegalovirus pRBG4 (Bouzat *et al.*, 1994).

#### Subunidad dup $\alpha 7$

El ADNc completo del gen CHRFAM7A (variante 1: NM\_139320.1) se sintetizó *de novo* (Biomatik, USA) con sitios de restricción apropiados para XbaI y HindIII. Este ADNc codifica para el segmento final de 27 aminoácidos correspondientes a la secuencia FAM7A (NH<sub>2</sub>-MQKYCIYQHFFQFQLLIQHLWIAANCDI), siguiendo con la secuencia de  $\alpha 7$ , iniciando en ADERFDA, que corresponde al final del *loop* A del sitio de unión de ACh. Posteriormente se subclonó en el plásmido pUC19, formando entonces pUC19-dup $\alpha 7$ .

El ADNc de dup $\alpha 7$  en pUC19-dup $\alpha 7$  se subclonó en el vector pRBG4. Por último, la secuencia de dup $\alpha 7$  clonada en pRBG4 fue confirmada por secuenciación mediante electroforesis capilar (Instituto de Biotecnología CICVyA, INTA, Argentina).

#### Subunidades mutantes

Se diseñaron oligonucleótidos con cambios de secuencia respecto a las subunidades

salvajes para luego emplear el kit comercial QuickChange® Site-Directed Mutagenesis (Agilente, UK), lo que permitió generar subunidades mutantes.

#### Subunidades de baja conductancia

Se construyeron subunidades mutantes que generan una disminución en la conductancia del canal. Se intercambiaron los residuos glutamina 428, ácido glutámico 432 y serina 436 presentes en el *loop* intracelular de la subunidad  $\alpha 7$  y los equivalentes en la subunidad  $\text{dup}\alpha 7$  por argininas en todos los casos. Se denominó a la subunidad de baja conductancia de  $\alpha 7$  como  $\alpha 7\text{LC}$  ( $\alpha 7$  *low conductance*) y a la correspondiente a  $\text{dup}\alpha 7$  como  $\text{dup}\alpha 7\text{LC}$  ( $\text{dup}\alpha 7$  *low conductance*).

#### Subunidades con mutaciones en el sitio de unión de agonista

Se construyó una subunidad mutante de  $\alpha 7$  que anula la cara complementaria del sitio de unión del agonista. Para ello se intercambió el residuo triptófano 55, presente en el *loop* D del sitio de unión del agonista, por treonina. Se denominó a esta subunidad  $\alpha 7\text{W55T}$ .

### **Cultivo celular**

Células BOSC 23 (Pear *et al.*, 1993), derivadas de la línea HEK 293, fueron mantenidas en cultivo en medio DMEM (*Dubecco's modified Eagle medium*, medio de Eagle modificado por Dubecco, Gibco) suplementado con 10% de suero fetal

bovino (Natocor), a 37 °C y en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **Transfección de células**

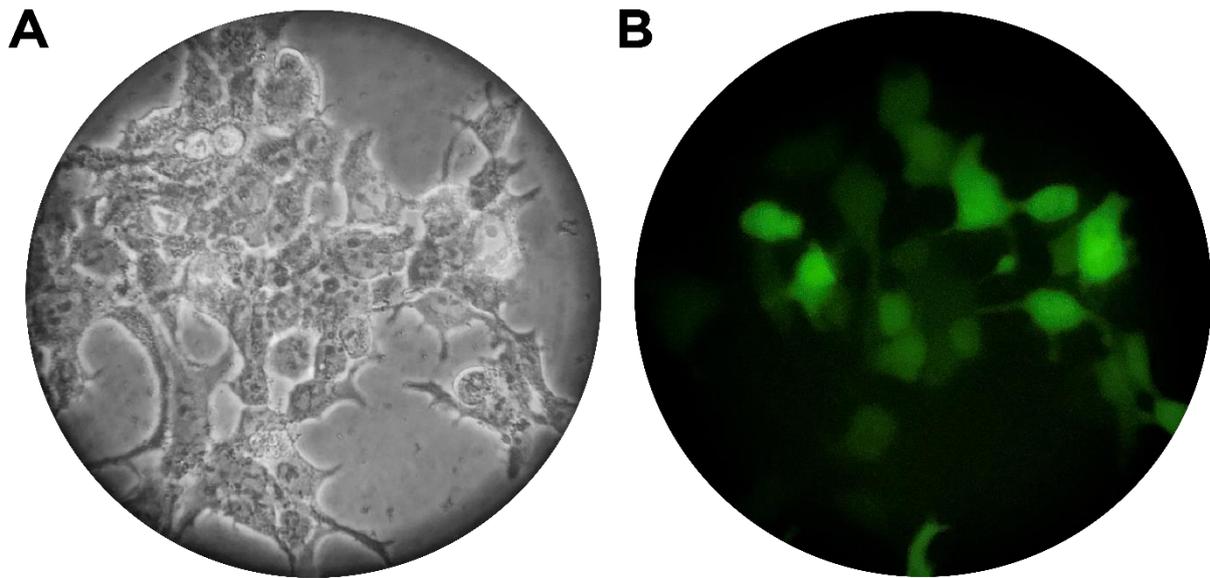
Se realizaron transfecciones mediante el método del fosfato de calcio con los ADNc de las subunidades. Para el mismo se emplearon cultivos celulares de células BOSC 23 con un 40-50% de confluencia.

Se realizaron las mezclas de ADNc de subunidades puras o sus combinaciones con otras subunidades según lo requerido para cada experimento.

Además de los plásmidos de las subunidades de receptor, se incorporaron también aquellos conteniendo las chaperonas Ric-3 y NACHO, necesarias para la expresión de los receptores. Las transfecciones se realizaron con una proporción molar subunidad/es de receptor:Ric-3:NACHO 2:1:1, con 4-6 µg de ADN total/cápsula de 35 mm.

Por último, en todas las transfecciones (salvo aquellas realizadas para microscopía) se incorporó un plásmido que codifica para la proteína verde fluorescente (GPF, *green fluorescent protein*) en proporción 1:20 con respecto al resto de ADN. Al ser excitada por luz ultravioleta, la GFP emite fluorescencia verde, lo que permite identificar a las células que hayan incorporado exitosamente los plásmidos durante la transfección (figura 12).

Las células se dejaron en contacto con el precipitado de fosfato de calcio-ADN por 14-18 h, luego de las cuales se realizó el cambio de medio, y se incubaron 24-48 h adicionales para permitir la expresión de los receptores.



**Figura 12** Microfotografías de células BOSC 23 transfectadas mediante el método del fosfato de calcio. Ambas representan el mismo campo visto en contraste de fases (A) y campo oscuro con fluorescencia a la luz UV (B). Las células de color verde observables en B son las que han incorporado el plásmido de la proteína verde fluorescente, lo que permite asumir que han incorporado también los plásmidos de las subunidades y chaperonas de interés, facilitando su selección para realizar los experimentos.

## **ESTUDIOS DE DESPLAZAMIENTO DE UNIÓN DE AGONISTA**

### **Marcación con $\alpha$ -Bungarotoxina**

Se colocaron cubreobjetos de vidrio circulares de 12 mm de diámetro estériles en placas de 35 mm, sobre los que se cultivaron células como se describió previamente.

Posteriormente se realizó la transfección con ADNc de  $\alpha 7$  (0,3  $\mu\text{g}$ ), dup $\alpha 7$  (0,9  $\mu\text{g}$ ) o con la combinación (1:3) de  $\alpha 7$  (0,3  $\mu\text{g}$ ) y dup $\alpha 7$  (0,9  $\mu\text{g}$ ). Se incluyeron también los ADNc de Ric-3 (1  $\mu\text{g}$ ) y NACHO (1  $\mu\text{g}$ ) en todas las condiciones. Como control negativo se utilizaron células transfectadas con ADN de plásmido irrelevante (1,2  $\mu\text{g}$ ). La cantidad total de ADN por transfección fue normalizada con la adición de ADN de plásmido vacío.

Luego de 72 h, se realizó la marcación de receptor en superficie celular incubando con el conjugado  $\alpha$ -Btx Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) a una concentración final de 1  $\mu$ g/mL por 1 hora en medio DMEM frío. Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído al 4%.

Se tomaron microfotografías de contraste de fase, fluorescencia, y confocal láser, utilizando un microscopio Nikon Eclipse E600 (LSCM; Leica DMIRE2) con objetivo 20X. La intensidad de fluorescencia, expresada como unidades arbitrarias, fue medida luego de delinear las áreas de interés manualmente con el software ImageJ 1.50b (National Institutes of Health, Bethesda, MD). El máximo de fluorescencia de una región de interés dada se midió dentro de una región  $\alpha$ -BTX positiva de la superficie celular, y posteriormente un área  $\alpha$ -Btx negativa del mismo tamaño (fuera de la célula) fue sustraída. La intensidad de fluorescencia promedio fue calculada para células elegidas al azar para cada condición experimental.

## **WESTERN BLOT**

El anticuerpo anti- $\alpha$ 7 utilizado fue generosamente provisto por la Doctora Cecilia Gotti (CNR Neuroscience Institute, Milan, Italia). Este anticuerpo reconoce la región intracelular de  $\alpha$ 7 (Gotti *et al.*, 1995).

Las células transfectadas se resuspendieron con buffer fosfato salino (PBS, *phosphate buffered saline*, KCl 0,9 mM, NaCl 138 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,1 mM,  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  1 mM, pH 7,4) y se lisaron en buffer RIPA (Tris 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, orto-vanadato sódico 2 mM, SDS 0,1%, Igepal 1%, deoxicolato de sodio 1%) en

presencia de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM. Cantidades iguales de extractos proteicos para cada condición de transfección (30 µg) se disolvieron en buffer Laemmli (Tris 6 mM pH 6,8, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002%, glicerol 20% y β-mercaptoetanol 5%; Laemmli, 1970) y se hirvieron durante 5 min. Posteriormente se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y se transfirieron a nitrocelulosa. Los *blots* se bloquearon durante toda la noche en leche descremada al 5% y Tween-20 al 0,3% en solución salina buffereada con Tris a 4 °C y se incubaron por dos horas con el anticuerpo primario anti-α7 (1-2.5 µg/mL) en leche descremada al 2,5% y solución salina Tris-buffereada Tween 20 al 0,15%.

Los inmunocomplejos se revelaron mediante quimioluminiscencia. Se empleó una dilución 1:1000 de anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (Amersham Biosciences GE Healthcare, Little Chalfont, England), y la quimioluminiscencia se generó mediante una solución de detección (luminol 1,25 mM, p-ácido cumárico 0,2 mM, peróxido de hidrógeno 0,06% (v/v), Tris-HCl 100 mM; pH 8,8). Los *immunoblots* fueron expuestos a un film autoradiográfico para su posterior revelado (Thermo Scientific, Waltham, MA).

## ***PATCH CLAMP***

### **Compuestos químicos utilizados**

Los agonistas empleados en las soluciones de pipeta y/o extracelulares fueron ACh o Ch (Sigma-Aldrich).

Los moduladores alostéricos empleados fueron PNU-120596 (Tocris) y

NS-1738 (Sigma-Aldrich).

El agonista alostérico empleado fue 4BP-TQS (Tocris).

Los compuestos amiloides empleados fueron  $\beta$ -Amiloide 1-40 (Tocris) y  $\beta$ -Amiloide 1-42 (Sigma-Aldrich).

### Registros de canal único

Los registros de canal único fueron obtenidos en la configuración *cell-attached* u *outside-out* (figura 15 y figura 16).

Para el caso de la configuración *cell-attached*, la composición del buffer

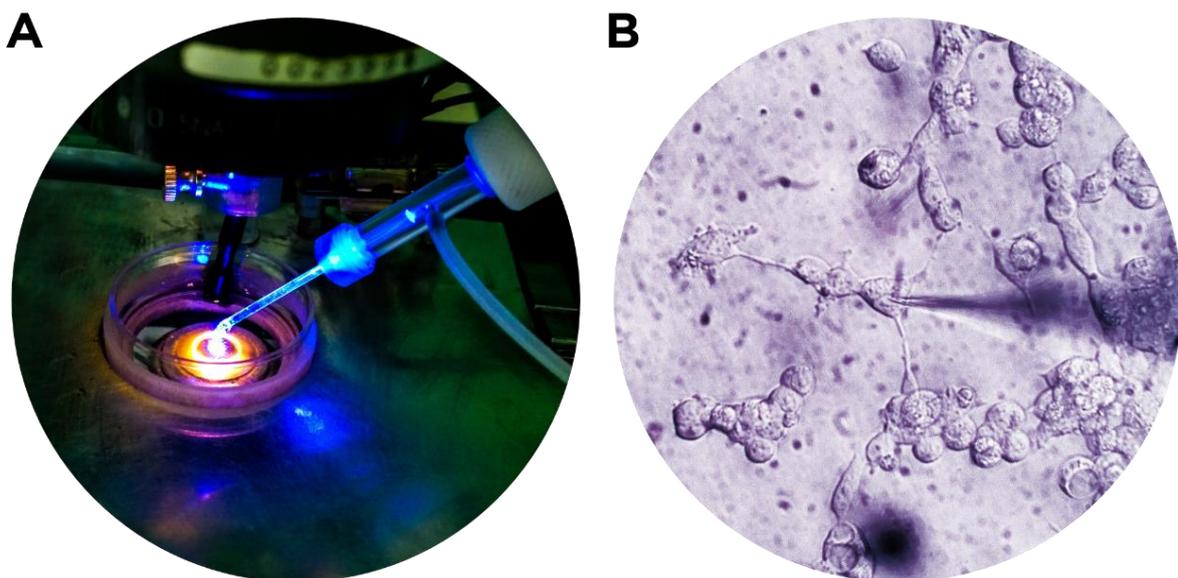


**Figura 13** Set up para la obtención de registros de *patch clamp* utilizada en esta tesis.

extracelular fue: KCl 142 mM, NaCl 5,4 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,7 mM y HEPES 10 mM, con el pH ajustado a 7,4. Las soluciones de pipeta fueron preparadas en el mismo buffer, y contuvieron los agonistas y/o compuestos a probar, según el caso.

En el caso de la configuración *outside-out*, la composición del buffer de pipeta (intracelular) fue: KCl 134 mM, HEPES 10 mM, EGTA 5 mM y MgCl<sub>2</sub> 1,0 mM; con el pH ajustado a 7,3. La solución extracelular empleada en las condiciones en las que el calcio estaba presente contuvo: NaCl 150 mM, HEPES 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM y MgCl<sub>2</sub> 1,0 mM; con el pH ajustado a 7,3. En el caso de las condiciones sin calcio, la composición del buffer fue: NaCl 150 mM, HEPES 10 mM, EGTA 1 mM y MgCl<sub>2</sub> 1,0 mM. Esta misma solución se empleó para la medición de la amplitud de los eventos en ausencia de Ca<sup>2+</sup> en la configuración *single-channel*.

Las corrientes de canal único fueron registradas a un potencial de



**Figura 14** A. Fotografía de una pipeta de punta microscópica colocada en el soporte del *headstage* del amplificador de *patch clamp*, la cual ha sido acercada a una cápsula conteniendo células transfectadas. B. Microfotografía de la punta de una pipeta en contacto con una célula transfectada durante la obtención del registro.

membrana de -70 mV utilizando un amplificador de *patch clamp* Axopatch 200B (Molecular Devices Corp., CA), digitalizadas a intervalos de 5  $\mu$ s mediante una interfase PCI-6111E (National Instruments, Austin, TX), y adquiridas mediante el software Acquire (Bruxton Corp, Seattle, WA).

Los registros obtenidos se analizaron utilizando el software QuB 2.0.0.28 (<https://www.qub.buffalo.edu>). Para facilitar el análisis, se adicionó un filtro de paso bajo digital de 3 kHz cuando en el registro en cuestión se utilizaron PNU-120596 o 4BP-TQS; o de 9 kHz cuando dichos compuestos no fueron utilizados para ese registro.

Los eventos de apertura y cierre de los canales se detectaron e idealizaron mediante el criterio del umbral de amplitud media. A partir de ellos, se ajustaron histogramas de tiempo de estado abierto y cerrado mediante el método de la máxima probabilidad (función MIL, *máximum interval likelihood*) con un *dead time* de 0,03-0,1 ms. Este análisis fue realizado en base a un modelo cinético cuyas curvas resultantes de la función de densidad de probabilidad ajustan los histogramas adecuadamente siguiendo el criterio de máxima probabilidad. Para  $\alpha 7$ , este análisis fue realizado agregando secuencialmente un estado abierto y/o cerrado a un modelo inicial cerrado  $\rightleftharpoons$  abierto de modo de ajustar el histograma correspondiente.

El análisis de los histogramas de duraciones de aperturas arroja modelos consistentes en tres estados de cierre y uno a dos estados de apertura para  $\alpha 7$  en la presencia de ACh; cuatro a cinco estados de cierre y dos a tres estados de apertura para  $\alpha 7$  en la presencia de ACh y NS-1738; y cinco a seis estados de cierre

y tres a cuatro estados de apertura para  $\alpha 7$  en presencia de ACh y PNU-120596, o 4BP-TQS.

Los *bursts* fueron identificados como una serie de aperturas sucesivas estrechamente separadas por cierres breves, precedidos y seguidos por cierres más largos que una duración crítica ( $\tau_{crit}$ ). El empleo de PAMs como PNU-120596 o agonistas alostéricos como 4BP-TQS produce el agrupamiento de *bursts* en clusters, los cuales también son precedidos y seguidos por cierres más largos que un tiempo crítico.

Tiempos críticos diferentes fueron calculados utilizando la función MIL entre cada componente cerrado. Los tiempos críticos entre el tercer y cuarto componente de estado cerrado para  $\alpha 7$  en la presencia de PNU-120596 o 4BP-TQS (entre 30 y 60 ms) fueron seleccionados en QuB para separar las partes del registro idealizado que contenían *clusters* en una selección, para definir la duración media del *cluster*.

Para definir clases de amplitudes de receptores generados por coexpresión de subunidades de alta y baja conductancia, todos los *clusters* fueron seleccionados sin discriminar su amplitud. Luego se construyeron histogramas de amplitud a partir de esta selección, lo que permitió distinguir a las distintas poblaciones. El número de poblaciones de amplitud y la duración media del *cluster* para cada una se determinaron mediante el algoritmo *X-means* incluido en el software QuB, que se basa en el criterio de información bayesiano. Los histogramas de tiempo de estado abierto y cerrado para cada amplitud se construyeron como se describió previamente.

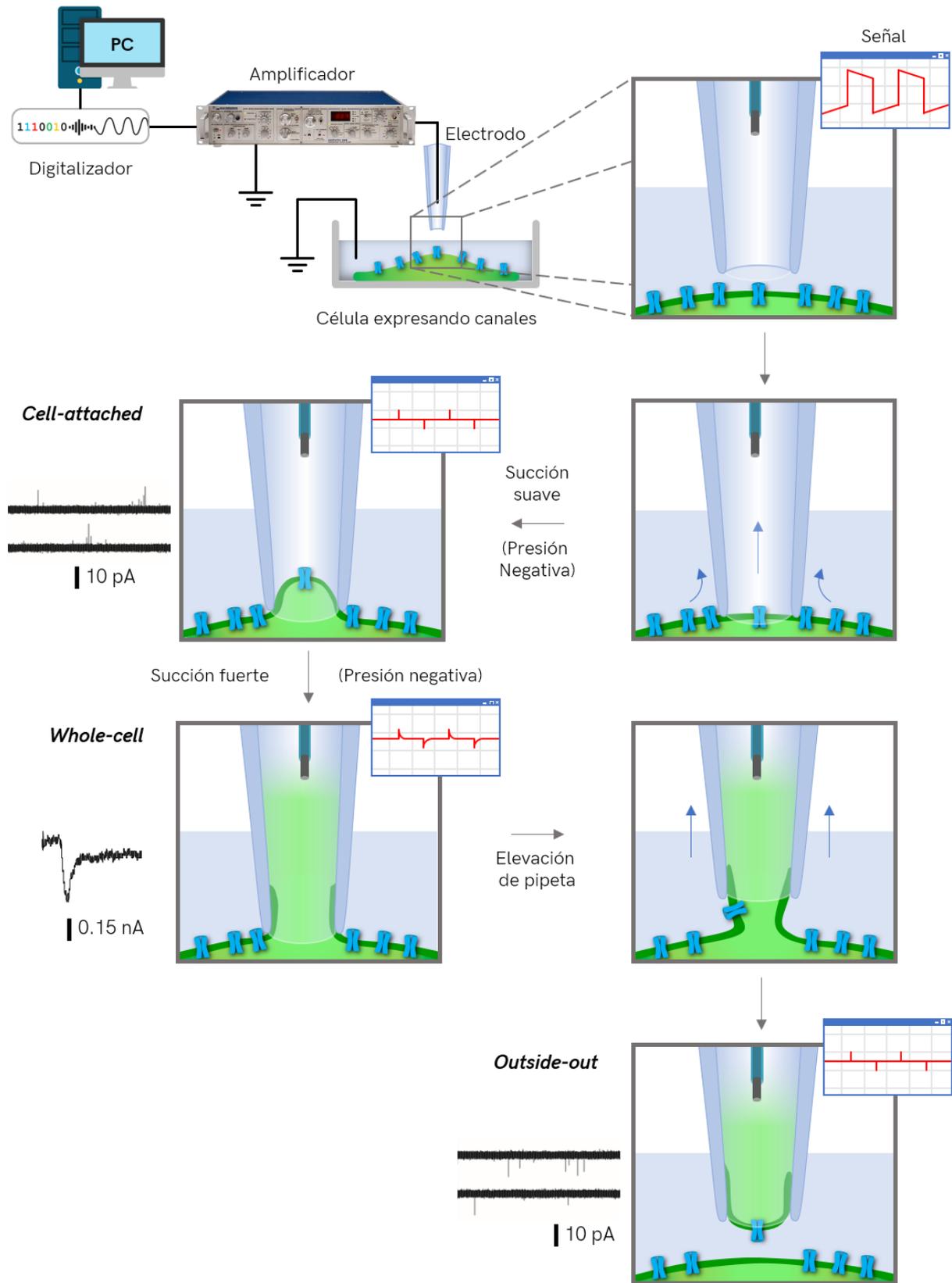
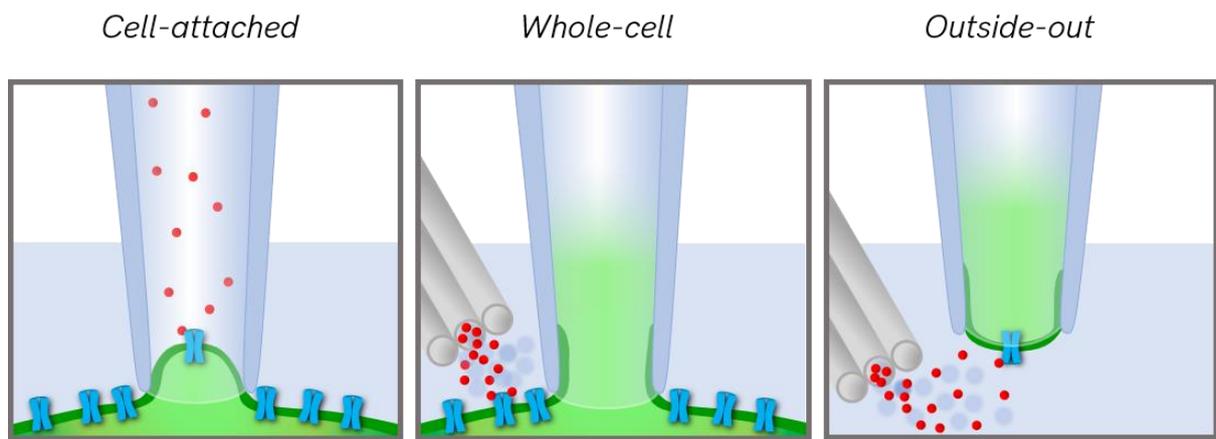


Figura 15 Esquema general de las distintas configuraciones utilizadas en la técnica de *patch clamp*.



**Figura 16** Detalle de las distintas configuraciones utilizadas en la técnica de *patch clamp*. Las esferas rojas representan los agonistas y/o moduladores empleados.

## Corrientes macroscópicas

Las corrientes macroscópicas se obtuvieron en la configuración *whole-cell*.

La composición del buffer de pipeta (intracelular) fue: KCl 134 mM, HEPES 10 mM, EGTA 5 mM y MgCl<sub>2</sub> 1,0 mM; con el pH ajustado a 7,3. La solución extracelular empleada en las condiciones en las que el calcio estaba presente contuvo: NaCl 150 mM, HEPES 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM y MgCl<sub>2</sub> 1,0 mM; con el pH ajustado a 7,3. En el caso de las condiciones sin calcio, la composición del buffer fue: NaCl 150 mM, HEPES 10 mM, EGTA 1 mM y MgCl<sub>2</sub> 1,0 mM.

Los registros se obtuvieron empleando los mismos instrumentos que en la configuración *single-channel*, a un potencial de membrana de -50 mV, filtrándose a 5 kHz y digitalizándose a 50 kHz. Las corrientes se adquirieron mediante el programa WinWCP 5.3.2 (University of Strathclyde, Glasgow, Escocia) y se analizaron empleando el programa Clampfit 10.7.0.3 (Molecular Devices, San José, CA).

Cada corriente analizada es el promedio de 3 a 5 corrientes consecutivas

obtenidas en el mismo sello.

Para la obtención de parámetros cinéticos, las corrientes se ajustaron a la función exponencial doble

$$I(t) = I_{\text{rápida}} e^{-t/\tau_{\text{rápida}}} + I_{\text{lenta}} e^{-t/\tau_{\text{lenta}}} + I_{\infty} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde  $I_{\text{rápida}}$  e  $I_{\text{lenta}}$  corresponden a la cantidad de corriente para cada componente de la función (rápido y lento),  $I_{\infty}$  es la corriente en el estado estacionario y  $\tau_{\text{rápida}}$  y  $\tau_{\text{lenta}}$  el tiempo de caída de cada componente «I», también denominados constantes de tiempo rápida y lenta, respectivamente.

### **Preparaciones de $\beta$ -Amiloide**

Liofilizados de  $\beta$ -Amiloide 1-40 o 1-42 se resuspendieron en DMSO a una concentración de 10 mg/mL (solución *stock* de péptido) y se almacenaron a -80 °C.

Para producir oligómeros se tomaron alícuotas de 10  $\mu$ L de solución *stock* a las que se añadieron 280  $\mu$ L de PBS para llevarlas a una concentración 80  $\mu$ M. Luego se mantuvieron en agitación a 300 rpm, a 37 °C, por 1 h. Por último, se mantuvieron a 4 °C hasta su uso en las soluciones de pipeta (Uranga *et al.*, 2010, 2016; Pascual *et al.*, 2017).

### **MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSFERENCIA**

Se colocaron 10  $\mu$ L de  $\beta$ -Amiloide 500 nM oligomérico en una grilla revestida con carbono y se incubaron por 60 s a temperatura ambiente. Se agregaron 10  $\mu$ L de

glutaraldehído 0,5%, incubando nuevamente 60 s a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó la grilla con agua y se secó. Finalmente, la grilla se fijó por 2 min con acetato de uranilo al 2% y se secó.

Las muestras se observaron utilizando un microscopio electrónico de transferencia Jeol 100 Cx II (Uranga *et al.*, 2016; Pascual *et al.*, 2017).

## **ESTUDIOS DE CAMBIOS CONFORMACIONALES EN EL RECEPTOR $\alpha 7$**

### **Mediciones fluorimétricas**

Se realizó una suspensión de células BOSC 23 en PBS. Se ajustó la absorbancia de la misma a 280 nm a aproximadamente 0,500 en un espectrofotómetro Jasco V-630 (JASCO Deutschland GmbH). La misma se incubó con oligómeros de  $\beta$ -Amiloide 1-40 o 1-42 (100 pM o 100 nM) por 20 minutos. En los casos en los que se realizaron las mediciones con el receptor  $\alpha 7$  en su estado desensibilizado la suspensión se incubó luego en presencia de carbamilcolina (Carb) 20 mM por 15 minutos adicionales.

Posteriormente, las suspensiones se titularon con concentraciones crecientes del bloqueador de canal abierto cristal violeta (CrV) disuelto en agua. Este es un bloqueador de canal abierto que emite fluorescencia al ser excitado con una fuente de luz externa. Después de cada agregado de CrV las muestras se incubaron por 15 minutos y se obtuvo el espectro de emisión de fluorescencia del CrV empleando un fluorímetro SLM 4800 (SLM Instruments, Urbana, IL) con un haz de luz polarizada verticalmente de un arco de mercurio/xenón Hannovia de

200W, obtenido con un polarizador Glan-Thompson (4 nm de rendijas de excitación y emisión). La longitud de onda de excitación fue 600 nm y los espectros de emisión de fluorescencia se obtuvieron desde 605 a 700 nm. Antes del primer agregado de CrV se obtuvo un espectro de emisión de fluorescencia basal para cada muestra, el cual luego fue restado a los espectros de emisión obtenidos en presencia de CrV.

Para determinar las constantes de disociación ( $K_D$ ) del CrV de  $\alpha 7$  se midió la intensidad máxima de CrV (a 623-625 nm) de cada uno de los espectros con concentración creciente de CrV y estos valores se graficaron en función de la concentración logarítmica del CrV (M) agregado. La curva sigmoidea resultante se ajustó con la función de Boltzmann y se calcularon las  $K_D$  utilizando el programa Origin 7.0 (OriginLab Corporation).

## **MODELADO MOLECULAR**

Se creó un modelo por homología para la región extracelular del receptor  $\alpha 7$  humano basado en la estructura de la quimera  $\alpha 7$ -AChBP (código PDB 5AFM, Spurny *et al.*, 2015). La secuencia de aminoácidos de la subunidad humana  $\alpha 7$  (número de acceso: CAD88995.1) se alineó y modeló utilizando el programa MODELLER 9v8 (Sali y Blundell, 1993). Se generaron diez modelos y se seleccionó el de menor energía y menor porcentaje de residuos en regiones desfavorables del gráfico de Ramachandran.

Para obtener un modelo 3D de dup $\alpha 7$  se utilizó el servidor I-TASSER (Zhang, 2008), el cual realiza predicciones de estructura y función para una secuencia de aminoácidos de interés mediante una combinación de modelado por

homología, subprocesamiento y modelado *ab initio*. Se generaron cinco modelos y se seleccionó el mejor en base al puntaje-C.

El análisis de estructura y las figuras se generaron utilizando el software Discovery Studio Visualizer 4.5 (Dassault Systems, BIOVIA, San Diego, USA).

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos se muestran como la media  $\pm$  desvío estándar. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas utilizando la prueba t de Student para muestras apareadas o análisis simple de varianza (ANOVA, *Analysis of Variance*) mediante el software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.). Las diferencias estadísticamente significativas fueron establecidas con valores  $p$  que se indican en las correspondientes tablas y/o figuras.

The background of the page is a complex, abstract pattern of thin, green, overlapping lines that form a dense, swirling, and somewhat chaotic web. The lines vary in thickness and direction, creating a sense of movement and depth. The overall effect is reminiscent of a microscopic view of a protein structure or a complex network of fibers.

## CAPÍTULO I

# **Modulación del receptor $\alpha 7$ por una subunidad $\alpha 7$ truncada**

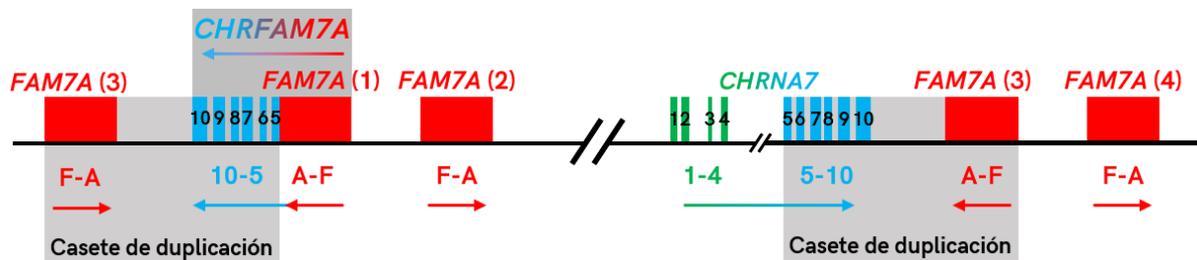
El gen de receptor nicotínico neuronal  $\alpha 7$ , *CHRNA7*, se expresa ampliamente en el cerebro y la periferia. Se encuentra en el cromosoma 15, en el que también se localizan otras subunidades de receptores nicotínicos tales como  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  y  $\beta 4$ . En particular, *CHRNA7* se ha mapeado en la banda q13-q14, una zona del genoma frecuentemente relacionada con varios desórdenes neuropsiquiátricos (Chini *et al.*, 1994).

La expresión y/o función disminuida de *CHRNA7* se ha asociado con enfermedades tales como esquizofrenia, desorden bipolar, déficit de atención con hiperactividad, enfermedad de Alzheimer, autismo, epilepsia y dificultades en el aprendizaje (Chini *et al.*, 1994; Freedman *et al.*, 2000; Harrison y Weinberger, 2005; Araud *et al.*, 2011; Neri *et al.*, 2012; Stephens *et al.*, 2012; Kunii *et al.*, 2015; Sinkus *et al.*, 2015).

El gen *CHRNA7* posee 10 exones. Un gen híbrido, *CHRFAM7A* surgió de una duplicación parcial de los exones 5-10 de *CHRNA7*, ubicada en el mismo cromosoma, centromérica con respecto al gen parental a 1,6 Mb. Esta duplicación interrumpió el elemento genético *FAM7A*, el cual contiene copias de exones del gen *ULK4* y otros exones que exhiben homología con el gen *GOLGA8B*, siendo este un evento que ocurrió relativamente reciente en la evolución, dado que *CHRFAM7A* se encuentra solo en humanos y no en primates superiores (Locke *et al.*, 2003).

*CHRNA7* y *CHRFAM7A* son altamente homólogos desde el exón 5 a la región 3' (>99%). En el gen híbrido se reemplazaron los exones 1-4 de *CHRNA7* con los exones D, C B y A de *FAM7A* (Sinkus *et al.*, 2015). La orientación de *CHRFAM7A* es reversa con respecto a *CHRNA7* (Gault *et al.*, 1998; Riley *et al.*,

2002, figura I.1). El producto de este gen híbrido es una proteína que carece de los primeros 95 aminoácidos codificados en *CHRNA7*, y en cambio posee una secuencia de 27 aminoácidos de *FAM7A*.



**Figura I. 1** Diagrama de la región del cromosoma 15 en la que se encuentran *CHRNA7* y *CHRFAM7A*, mostrando la disposición de los distintos elementos que conforman los genes.

El gen *CHRFAM7A* se localiza en una región compleja del cromosoma 15 (figura I.1), que incluye muchas duplicaciones altamente variables, dando como resultado diferentes variantes en el número de copias. Estos múltiples polimorfismos están asociados con el riesgo de desarrollar distintas enfermedades neurológicas y psiquiátricas como esquizofrenia, desorden bipolar, autismo y epilepsias idiopáticas. Entre las diferentes variantes en el número de copias presentes en el cromosoma 15, otra variante del gen de la subunidad truncada ha sido descrita, que presenta una delección de dos pares de bases en el exón 6 de *CHRFAM7A*, asociada con esquizofrenia y déficits en el filtrado sensorial. (Sinkus *et al.*, 2015).

El número de copias de *CHRFAM7A* varía entre los individuos: algunos poseen solo una copia del gen y raramente se encuentra ausente. El número de copias de *CHRNA7* no es tan variable; su delección y duplicación completa son raras. El genotipo más común es de dos copias de cada gen (Flomen *et al.*, 2006;

Sinkus *et al.*, 2009). De todos modos, la posible significancia funcional de esta duplicación sigue siendo desconocida.

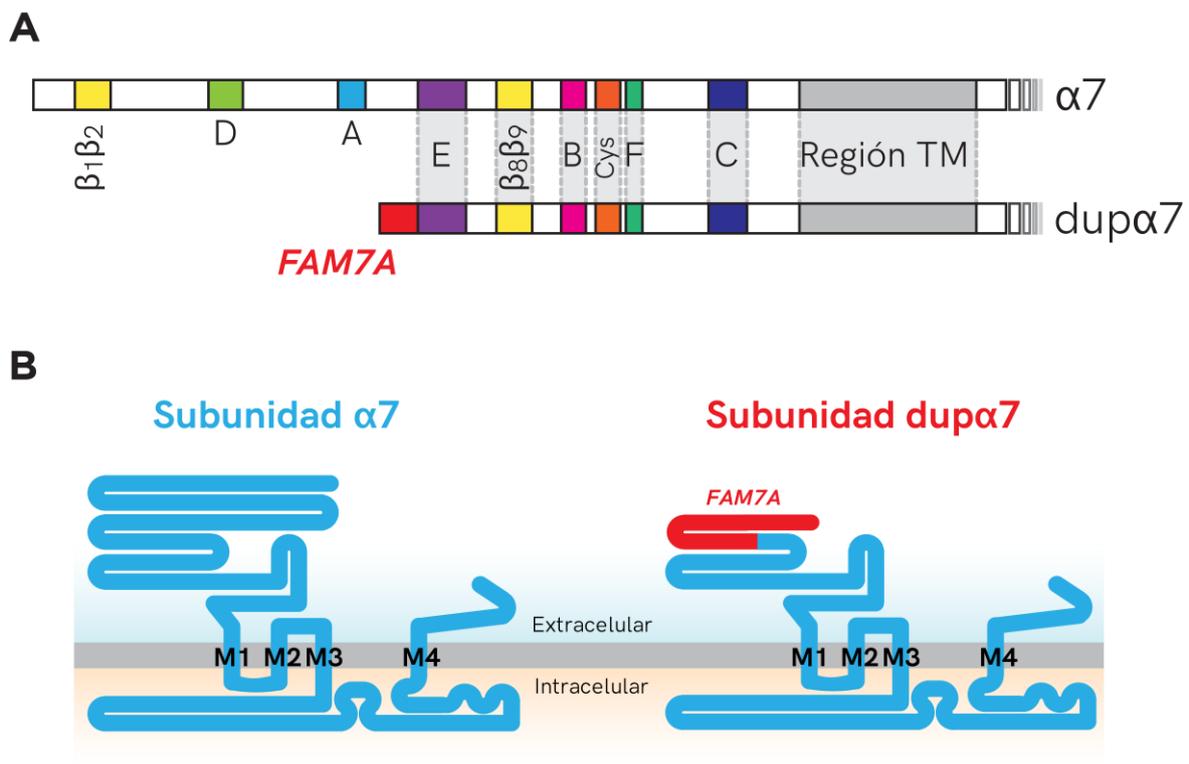
El transcripto de *CHRFAM7A*, *dupa7*, se ha identificado en hipocampo, corteza, cuerpo calloso, tálamo, putamen, núcleo caudado y cerebelo (de Lucas-Cerrillo *et al.*, 2011). También se han encontrado niveles altos en leucocitos humanos (Villiger *et al.*, 2002; Costantini *et al.*, 2015) y en células epiteliales (Dang *et al.*, 2015). En monocitos primarios y macrófagos, el tratamiento con lipopolisacárido disminuye la expresión de *dupa7* (Benfante *et al.*, 2011). Estos hallazgos, además de mostrar la amplia distribución en la expresión de este gen, sugieren que la isoforma duplicada podría tener un rol en el sistema inmune y la vía antiinflamatoria colinérgica.

La proteína final, *dupa7*, es una subunidad de receptor truncada que carece de los primeros 95 aminoácidos de  $\alpha 7$ , incluyendo los *loops* A y D del sitio de unión del agonista, el péptido señal y un sitio de glucosilación. En cambio, posee 27 aminoácidos de *FAM7A* en el dominio N-terminal (Gault *et al.*, 1998; Sinkus *et al.*, 2015, figura I.2).

Esta subunidad de receptor ha sido expresada en sistemas heterólogos, en líneas celulares de mamíferos y en ovocitos de *Xenopus*. Estudios de inmunocitoquímica en células GH4C1 sugieren que *dupa7* puede alcanzar la periferia celular, encontrándose en una localización un poco más interna que  $\alpha 7$ . Pese a ello, no se detectaron respuestas de corrientes macroscópicas luego de la exposición a agonistas del receptor  $\alpha 7$  (de Lucas-Cerrillo *et al.*, 2011).

El rol de la subunidad *dupa7* permanece poco claro, dado que se ha

demostrado en ovocitos una reducción en las corrientes macroscópicas del receptor  $\alpha 7$  cuando se realiza una cotransfección de las subunidades  $\text{dup}\alpha 7$  y  $\alpha 7$ , compatible con un rol modulador negativo (Araud *et al.*, 2011; de Lucas-Cerrillo *et al.*, 2011). Esto aún no ha podido ser probado en neuronas. Por otra parte, se ha propuesto que la subunidad  $\text{dup}\alpha 7$  se puede ensamblar con subunidades  $\alpha 7$  utilizando marcas fluorescentes, ya que ambas subunidades se encuentran localizadas en la membrana en posiciones muy cercanas (Wang *et al.*, 2014). Sin embargo, la estequiometría y función de los receptores híbridos resultantes de este ensamblaje seguían siendo desconocidas.

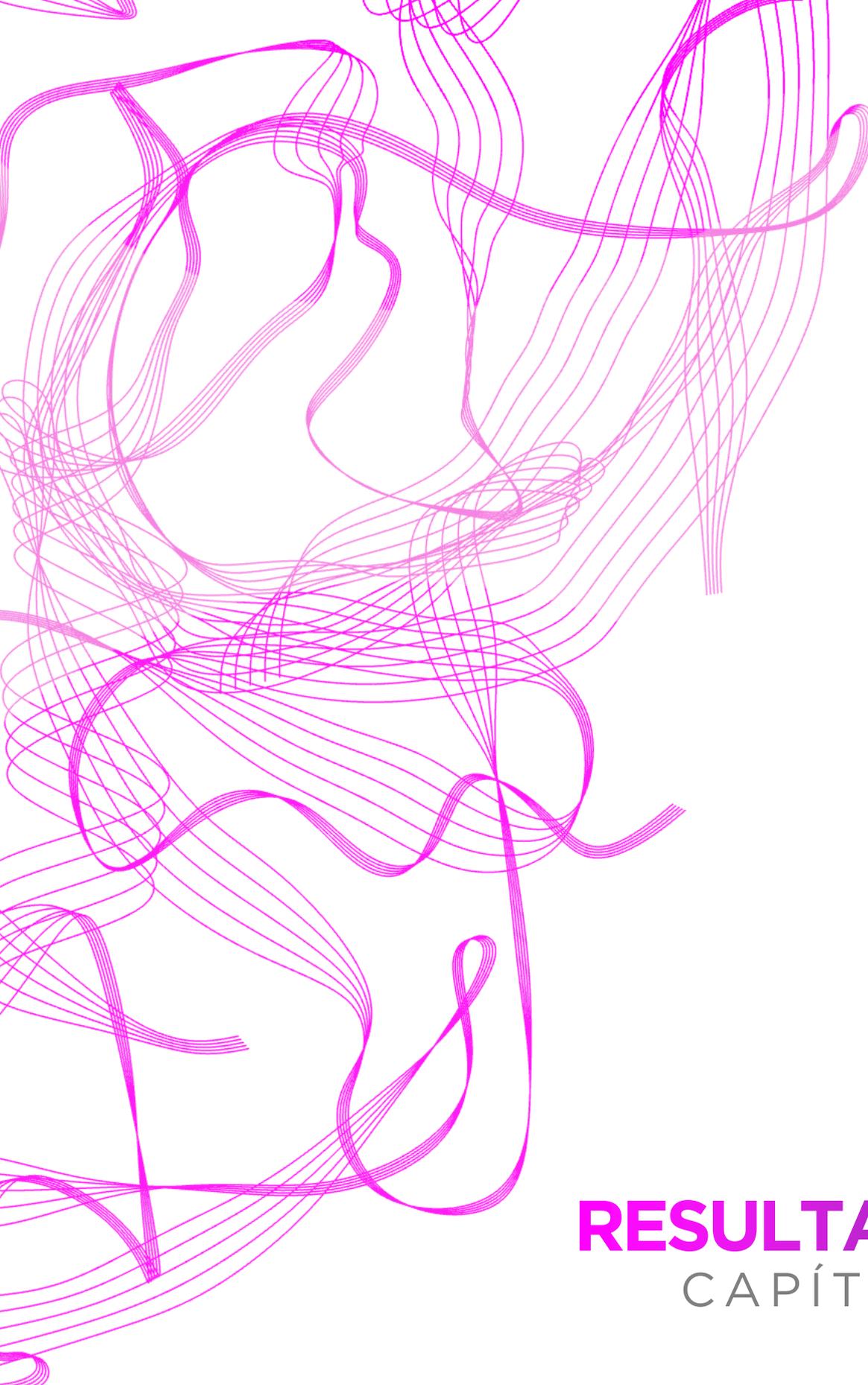


**Figura I.2** A. Diagrama de las subunidades  $\alpha 7$  y  $\text{dup}\alpha 7$  que muestra los *loops* que forman el sitio de unión de ACh (A-F), *loops* en la región de acoplamiento ( $\beta_1\beta_2$ , cys y  $\beta_8\beta_9$ ), la región transmembrana y el fragmento **FAM7A** de la subunidad  $\text{dup}\alpha 7$  en el dominio N-terminal. B. Diagrama de las subunidades  $\alpha 7$  y  $\text{dup}\alpha 7$  insertas en la membrana plasmática, destacando en rojo el fragmento **FAM7A** en  $\text{dup}\alpha 7$  y las cuatro hélices transmembrana M1-M4.

# OBJETIVOS

Dado el gran desconocimiento acerca de la función de la subunidad dup $\alpha$ 7 a pesar de su importancia por su posible asociación con desordenes neurológicos e inflamatorios, los objetivos propuestos del presente capítulo son:

- Establecer el posible rol fisiológico de la subunidad dup $\alpha$ 7.
- Determinar la contribución de la subunidad dup $\alpha$ 7 a la expresión en superficie de membrana de  $\alpha$ 7.
- Determinar si los receptores homopentaméricos de dup $\alpha$ 7 son funcionales y, si lo son, caracterizar los mismos a nivel de corrientes macroscópicas y canal único.
- Generar heteropentámeros formados por las subunidades  $\alpha$ 7 y dup $\alpha$ 7, determinar si son funcionales, y caracterizar sus propiedades.
- Definir la estequiometría y arreglo molecular de los heteropentámeros  $\alpha$ 7/dup $\alpha$ 7.



# RESULTADOS

## CAPÍTULO I

## EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE DUP $\alpha$ 7 EN CÉLULAS DE MAMÍFERO

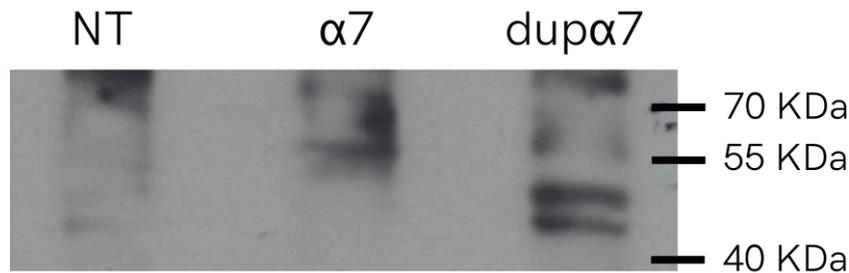
Para estudiar la función de la subunidad dup $\alpha$ 7 en sistemas heterólogos, se incorporó el ADNc de dup $\alpha$ 7 en el vector de expresión pRBG4.

El ADNc de dup $\alpha$ 7 incluye una secuencia de 1236 nucleótidos previamente depositada en NCBI, la que corresponde a la isoforma 1 del gen *CHRFAM7A* (número de acceso: NM\_139320). La traducción desde la metionina inicial en el exón B de *CHRFAM7A* da como resultado una proteína que posee aminoácidos codificados por parte de los exones B y A del gen *FAM7A*, y la totalidad de los exones 5 a 10 de *CHRNA7*.

La proteína final contiene un dominio N-terminal con 27 residuos de *FAM7A* seguidos por la secuencia de  $\alpha$ 7 desde el aminoácido 96, por lo que carece de los *loops* A y D del sitio de unión de ACh (figura I.2A).

Para establecer si la subunidad truncada dup $\alpha$ 7 codificada en nuestro ADNc es capaz de transcribirse y traducirse en nuestro sistema heterólogo, se transfectaron células BOSC 23 con plásmidos conteniendo los ADNc de dup $\alpha$ 7 o  $\alpha$ 7, junto con aquellos conteniendo los ADNc de las proteínas chaperonas Ric-3 y NACHO, en una proporción molar subunidad de receptor:Ric-3:NACHO 2:1:1. La expresión de las subunidades  $\alpha$ 7 y dup $\alpha$ 7 fue detectada mediante *Western blot* a partir de lisados de células, utilizando un anticuerpo primario contra el *loop* intracelular M3-M4 que es común a ambas subunidades (Gotti *et al.*, 1995).

El ensayo de *Western blot* reveló bandas en el rango de 55-57 kDa en células transfectadas con el ADNc de  $\alpha$ 7, y en un rango de masa molecular más bajo (45-



**Figura I.3** Expresión de dupα7 en células BOSC 23 detectada mediante *Western blot*.

50 kDa) en aquellas transfectadas con el ADNc de dupα7 (figura I.3). Estas bandas, que no fueron detectadas en células no transfectadas, son compatibles con las masas moleculares esperadas de las respectivas subunidades. La doble banda que se puede observar en la figura ha sido descrita anteriormente para α7, pudiendo tratarse de distintas formas de glicosilación o modificación post traduccional (Tsetlin *et al.*, 2007; Drisdell y Green, 2018).

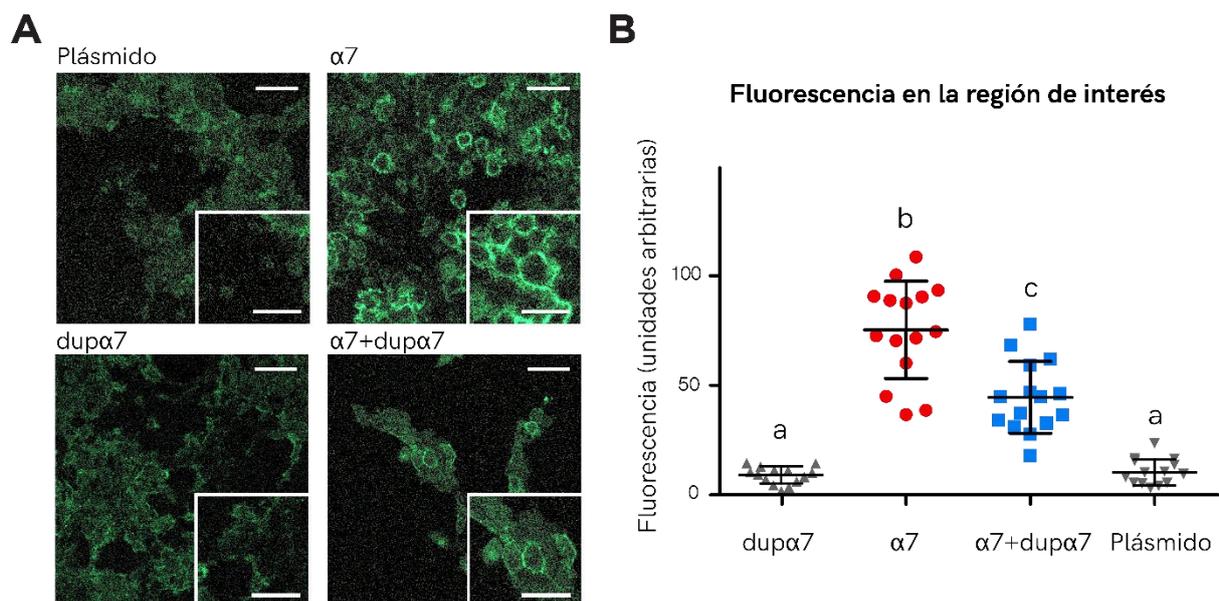
Los resultados de ensayo de *Western blot* confirman, entonces, que la subunidad dupα7 se traduce en nuestro sistema de expresión heterólogo.

### **DETECCIÓN DE DUPα7 MEDIANTE ENSAYOS DE MICROSCOPIA CONFOCAL**

La α-BTX es un antagonista selectivo del receptor α7 que lo inactiva irreversiblemente al unirse al sitio de unión de ACh y es utilizada como marcador de su expresión en la superficie celular (de Lucas-Cerrillo *et al.*, 2011). Una vez establecido que la subunidad dupα7 se traduce en nuestro sistema heterólogo, decidimos determinar si forma receptores en superficie y si afecta a la expresión del receptor α7 combinando ensayos de marcación con microscopía confocal.

Se transfectaron células BOSC 23 con los ADNc de  $\alpha 7$ , dup $\alpha 7$  o la combinación de ambos en proporción 1:3  $\alpha 7$ :dup $\alpha 7$ . Se eligió incrementar la proporción de dup $\alpha 7$  con respecto a  $\alpha 7$  para favorecer la expresión y/o ensamblaje de dup $\alpha 7$ . Luego se realizó la marcación con  $\alpha$ -BTX unida al fluoróforo Alexa Fluor 488 (Alexa Fluor 488- $\alpha 7$ -BTX) y posteriormente se obtuvieron imágenes de microscopía confocal láser. Además, se realizó un control negativo transfectando con plásmido que no contenía el ADNc de las subunidades. En todos los casos se incluyeron los plásmidos de las chaperonas Ric-3 y NACHO.

El análisis de la intensidad de la fluorescencia de membrana mediante el software ImageJ mostró un alto nivel de fluorescencia en las células transfectadas



**Figura 1.4** Marcación con  $\alpha$ -Btx de células BOSC 23 transfectadas con los ADNc de  $\alpha 7$  y/o dup $\alpha 7$ . A. Imágenes de microscopía confocal representativas que muestran la fluorescencia de membrana generada en células transfectadas con plásmido irrelevante o con el ADNc de  $\alpha 7$ , dup $\alpha 7$  o la combinación 1:3 de  $\alpha 7$ /dup $\alpha 7$  marcadas con  $\alpha$ -Btx unida a Alexa Fluor 488. Se incluye una imagen ampliada en la esquina inferior derecha de cada panel. La escala de las barras corresponde a 40  $\mu$ m en las imágenes no ampliadas y a 20  $\mu$ m en las imágenes ampliadas. B. Gráfico de dispersión de intensidades de fluorescencia en la región de interés de células individuales transfectadas. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  desvío estándar (n=15 en cada condición). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Las comparaciones se realizaron mediante análisis de varianza empleando la prueba de múltiples comparaciones de Sidak.  $p < 0,0001$ .

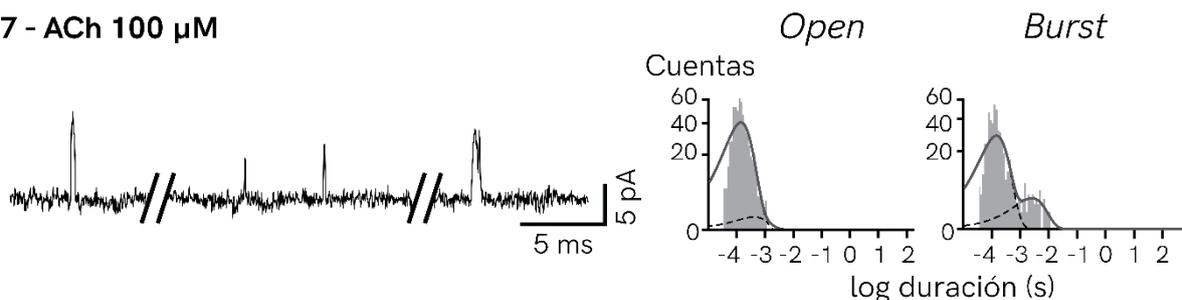
con el ADNc de la subunidad  $\alpha 7$ , en comparación con las células transfectadas con plásmido vacío (control negativo). Las imágenes de las células transfectadas con el ADNc de  $\text{dup}\alpha 7$  mostraron una fluorescencia similar a la observada en la superficie de las células del control negativo. Las células cotransfectadas con  $\text{dup}\alpha 7$  y  $\alpha 7$  mostraron una fluorescencia intermedia, menor a las transfectadas solo con  $\alpha 7$ , pero mayor a la del control negativo (figura I.4).

Estos resultados demuestran que la subunidad  $\text{dup}\alpha 7$  no forma sitios unidores de  $\alpha$ -Btx o no forma receptores homopentaméricos en la membrana celular y que reduce la cantidad de sitios de unión para  $\alpha$ -Btx cuando se encuentra presente junto con el receptor  $\alpha 7$ . Dado que la subunidad  $\text{dup}\alpha 7$  carece de una región que forma parte del sitio de unión de agonista, este resultado podría ser explicado mediante la incorporación de la subunidad truncada en los receptores  $\alpha 7$ , formando receptores heteropentaméricos. Alternativamente,  $\text{dup}\alpha 7$  podría disminuir la expresión de receptores  $\alpha 7$  en la superficie celular, por competencia con su ensamblado.

## **RESPUESTA FUNCIONAL DE $\text{DUP}\alpha 7$ FRENTE A AGONISTAS ORTOSTÉRICOS O ALOSTÉRICOS**

Para determinar si es posible detectar homopentámeros funcionales de  $\text{dup}\alpha 7$  que, aunque no unan  $\alpha$ -Btx, sean funcionales, se realizaron transfecciones de la subunidad en células BOSC 23, y posteriormente se realizaron ensayos de *patch clamp*. Para ello se utilizó la configuración *cell-attached*, incluyendo los agonistas en la solución de pipeta; y la configuración *whole-cell*, incluyendo los agonistas en las soluciones extracelulares.

$\alpha 7$  - ACh 100  $\mu$ M



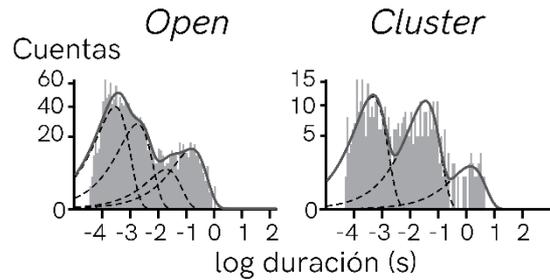
**Figura I.5** Corriente de canal único representativa del receptor  $\alpha 7$  activado por ACh 100  $\mu$ M. A la derecha se muestran histogramas típicos de duración de las aperturas individuales (*open*) y *bursts*. Potencial de membrana: -70 mV.

En presencia de ACh 100  $\mu$ M, el receptor  $\alpha 7$  exhibe aperturas individuales breves, de aproximadamente 300  $\mu$ s, separadas por cierres largos; o, menos frecuentemente, unas pocas aperturas en rápida sucesión, separadas por cierres breves, conocidas como *bursts* (figura I.5). Estos últimos corresponden a aperturas de una única molécula de receptor. La dificultad en la detección de estos eventos radica en que sus duraciones se encuentran en el límite de resolución de la técnica, por lo que muchos de ellos no llegan a detectarse o resolverse completamente.

Los potenciadores alostéricos positivos (PAMs), como el PAM de tipo II PNU-120596, son utilizados como herramientas para aumentar la probabilidad de apertura y la duración del canal en el estado abierto del receptor  $\alpha 7$ . Disminuyendo la velocidad de desensibilización, el PNU-120596 favorece la permanencia de los canales en la conformación abierta, facilitando la detección de eventos de apertura infrecuentes y, al mismo tiempo, permitiendo el registro preciso de su amplitud.

En células que expresan al receptor  $\alpha 7$ , ACh, en la presencia de PNU-120596, provoca aperturas de larga duración ( $159,1 \pm 69,6$  ms) separadas por cierres breves, agrupadas en *bursts*, que a su vez se agrupan en largos períodos de activación denominados *clusters*, de aproximadamente uno a tres segundos de

**$\alpha 7$  - ACh 100  $\mu$ M + PNU-120596 1  $\mu$ M**



**Figura I.6** Corriente de canal único representativa de  $\alpha 7$  activado por ACh 100  $\mu$ M y potenciado por PNU-120596 1  $\mu$ M. A la derecha se muestran histogramas típicos de duración de las aperturas (*open*) individuales y *clusters* Potencial de membrana: -70 mV.

duración (figura I.6). Los histogramas de estado abierto se ajustan bien con tres componentes exponenciales (ver metodología).

En presencia de ACh 100  $\mu$ M y PNU-120596 1  $\mu$ M no fueron detectados *clusters* o aperturas individuales en células transfectadas con el ADNc de dup $\alpha 7$  (figura I.7), en concordancia con la falta de respuestas macroscópicas previamente reportadas (de Lucas-Cerrillo *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014). Estos experimentos se realizaron en paralelo con registros de canal único de células del mismo lote transfectadas bajo las mismas condiciones con el ADNc de  $\alpha 7$ , para confirmar que la transfección era exitosa y los receptores eran capaces de activarse, descartando así fallas experimentales. Como control adicional, se realizaron registros con células transfectadas solo con Ric-3 y NACHO, las cuales no mostraron actividad de canales en la presencia de ACh 100  $\mu$ M y PNU-120596 1  $\mu$ M.

**dup $\alpha 7$  - ACh 100  $\mu$ M + PNU-120596 1  $\mu$ M**

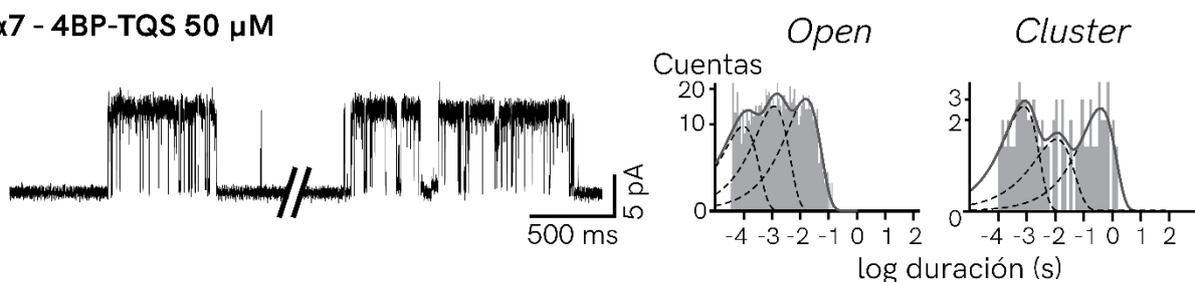


**Figura I.7** Registro de *patch clamp* en la configuración *single-channel* en el que se aprecia la falta de respuesta de dup $\alpha 7$  frente a ACh 100  $\mu$ M y PNU-120596 1  $\mu$ M. Potencial de membrana: -70 mV.

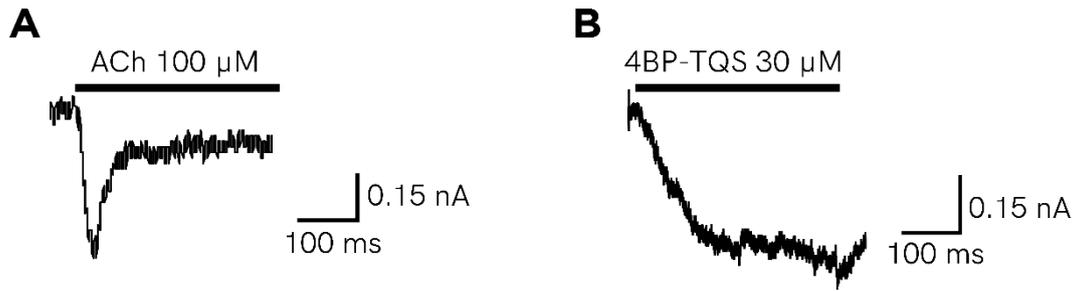
Dado que la subunidad dupα7 carece de los *loops* A y D del sitio de unión para agonistas ortostéricos, lo que imposibilitaría su activación mediante ACh, se intentó detectar la presencia de homopentámeros dupα7 funcionales mediante un agonista alostérico del receptor α7, 4BP-TQS. Este agonista alostérico se une a un sitio localizado en la región transmembrana de las subunidades que es conservado entre α7 y dupα7. La hipótesis de base fue que, si la carencia de los *loops* A y D del sitio de unión de ACh de la subunidad dupα7 era la causa de la ausencia de respuesta, un ligando que active al receptor desde un sitio conservado entre ambas subunidades, donde no se requiera integridad del sitio ortostérico, podría permitir la detección de corrientes unitarias o macroscópicas generadas por homopentámeros de dupα7.

En el receptor α7, 4BP-TQS en concentración 50 μM provoca eventos de apertura prolongados ( $65 \pm 24$  ms) que se agrupan en *clusters* de larga duración ( $1539 \pm 682$  ms), de manera similar a lo que se observa al activar al receptor con ACh y PNU-120596 (figura I.8). Las corrientes macroscópicas provocadas por este agonista alostérico decaen más lentamente que aquellas provocadas por ACh (figura I.9).

α7 - 4BP-TQS 50 μM

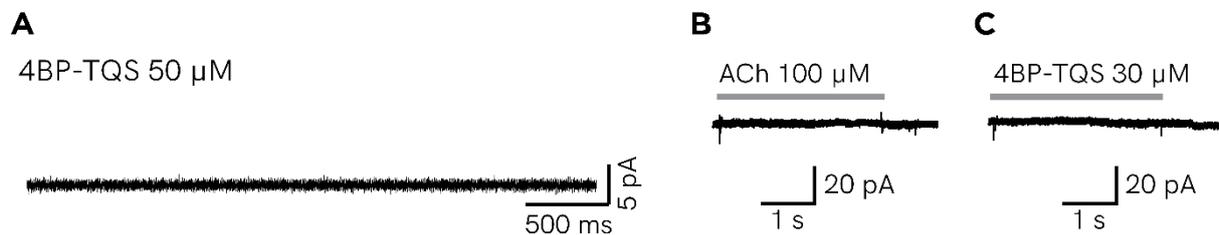


**Figura I.8** Corriente de canal único representativa del receptor α7 activado por 4BP-TQS 50 μM. A la derecha se muestran histogramas típicos de duración de las aperturas (*open*) individuales y *clusters* Potencial de membrana: -70 mV.



**Figura 1.9** Corrientes macroscópicas del receptor  $\alpha 7$  en la configuración *whole-cell*, generadas por la activación del receptor con ACh 100  $\mu\text{M}$  (A) y 4BP-TQS 30  $\mu\text{M}$  (B). Potencial de membrana: -50 mV.

Pese a lo expuesto previamente en cuanto a la conservación del sitio alostérico de unión de 4BP-TQS entre las subunidades  $\alpha 7$  y dupa7, no se detectaron eventos de canal único o corrientes macroscópicas provocadas por 4BP-TQS en células que expresaban dupa7, por lo que se concluyó que esta subunidad no puede formar receptores homopentaméricos funcionales detectables en la superficie celular.



**Figura 1.10** Registros de *patch clamp* en las configuraciones *single-channel* (A) y *whole-cell* (B y C) de células transfectadas con el ADNc de dupa7 en los que se aprecia la falta de respuesta frente a 4BP-TQS 50  $\mu\text{M}$  (A), ACh 100  $\mu\text{M}$  (B) y 4BP-TQS 30  $\mu\text{M}$  (C). Potencial de membrana en A: -70 mV. Potencial de membrana en B y C: -50 mV.

## RECEPTORES HETEROMÉRICOS $\alpha 7$ /DUPA7 FUNCIONALES

En principio, un co-ensamblado de  $\alpha 7$  y dupa7 podría ser detectado mediante *patch clamp* co-expresando ambas subunidades y realizando registros tales como los expuestos anteriormente. Sin embargo, por una parte, es esperable que la actividad de canal único derivada del receptor  $\alpha 7$  homomérico sea la

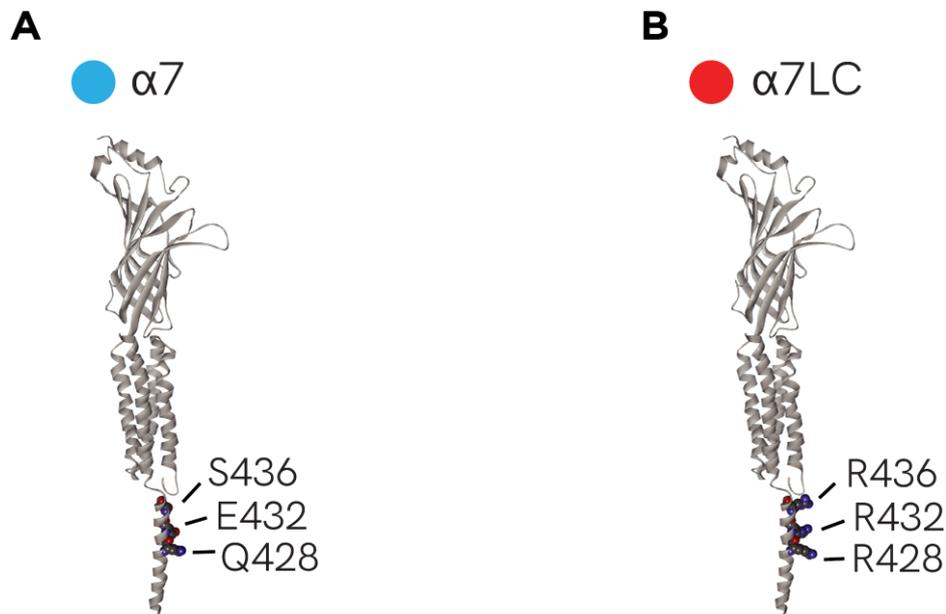
predominante, y, por otra, arreglos de heterómeros funcionales podrían ser cinéticamente indistinguibles de los homopentaméricos. Es necesario, entonces, emplear una estrategia que permita distinguir inequívocamente en los registros de *patch clamp* a los eventos de activación provenientes de heterómeros funcionales  $\alpha 7$ /dupa7 de los provenientes de homómeros  $\alpha 7$  y, además, asociar de manera directa cada apertura con la estequiometría del heterómero que la generó.

Para determinar si el co-ensamblado de dupa7 y  $\alpha 7$  lleva a la formación de receptores heteroméricos funcionales y para establecer la estequiometría de los mismos, se aplicó la estrategia *electrical fingerprinting*, desarrollada previamente en nuestro laboratorio.

La estrategia *electrical fingerprinting* se basa en la expresión combinada de una subunidad de receptor en conjunto con una subunidad del mismo receptor que contiene mutaciones que afectan a la conductancia unitaria del receptor y, mediante registros de *patch clamp*, la medición de la amplitud del canal como reportera de la estequiometría del receptor.

En el caso de la subunidad  $\alpha 7$ , se realizó la sustitución de tres aminoácidos en la región del *loop* intracelular M3-M4 por argininas (Q428R, E432R y S436R; figura I.11), lo que disminuye drásticamente la conductancia del receptor. Esta subunidad, denominada  $\alpha 7$ LC ( $\alpha 7$  *low conductance*) forma receptores funcionales que pueden ser evidenciados mediante corrientes macroscópicas en la configuración *whole-cell* y cuya cinética es idéntica a la del receptor  $\alpha 7$  nativo (Rayes *et al.*, 2009; Andersen *et al.*, 2011, 2013; daCosta y Sine, 2013; daCosta *et al.*, 2015). Sin embargo, a nivel de canal único no se detectan episodios de

activación, dado que la amplitud de los eventos unitarios está por debajo del límite de detección (figura I.12B).



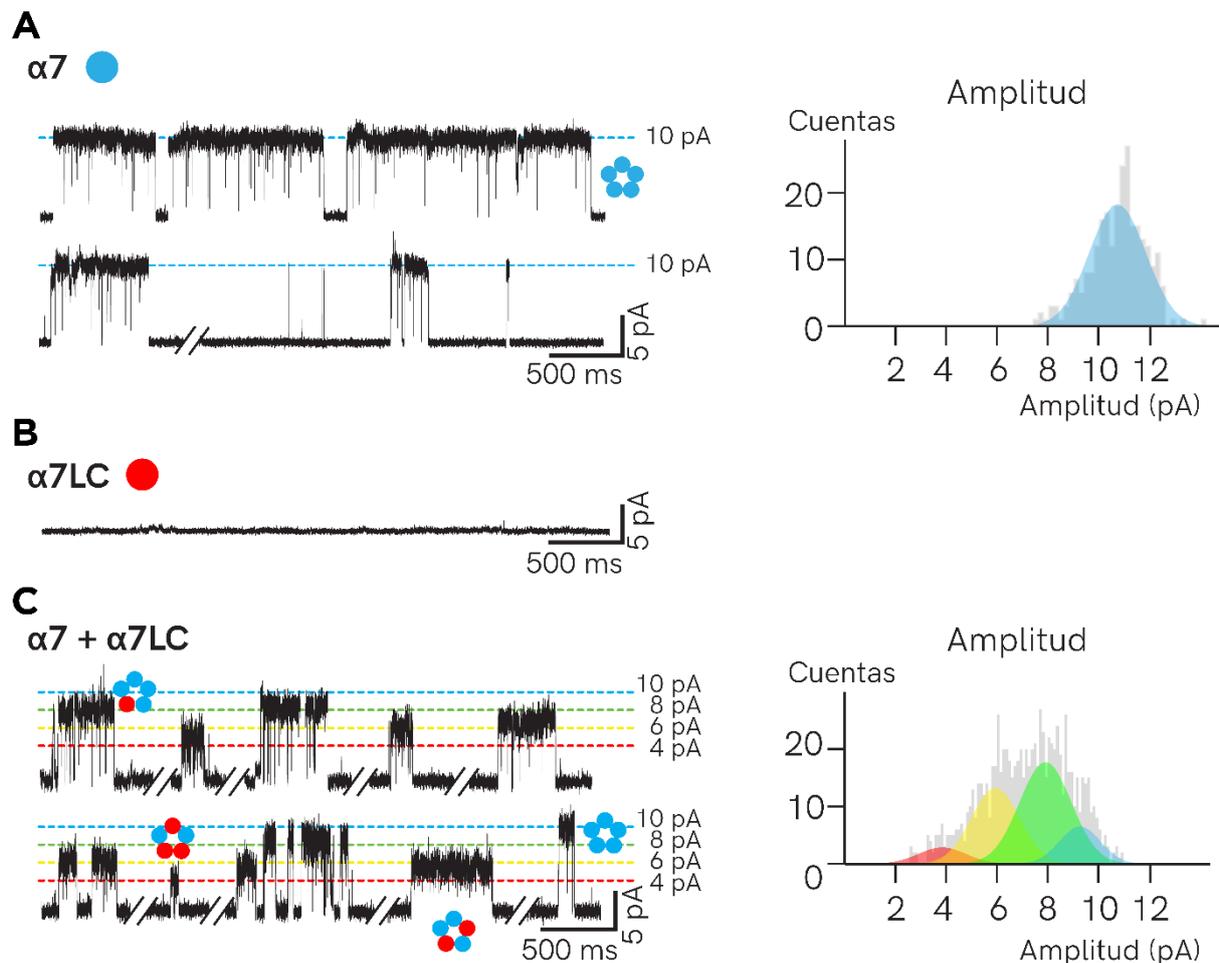
**Figura I.11** Estructura tridimensional de las subunidades  $\alpha 7$  de alta (A,  $\alpha 7$ ) y baja (B,  $\alpha 7LC$ ) conductancia, destacando los aminoácidos del dominio intracelular involucrados en la conductancia de cada subunidad.

Como se explicó anteriormente, al realizar registros de canal único del receptor  $\alpha 7$  en presencia de ACh 100  $\mu M$  se observan aperturas breves, muchas de las cuales se encuentran por debajo del límite de resolución temporal de la técnica. Como consecuencia de esto, los eventos muestran amplitudes variables, y, al realizar el histograma de amplitudes no se puede definir una población de eventos con una amplitud determinada. Para superar este inconveniente se utiliza en la solución de pipeta, junto con ACh, el PAM de tipo II PNU-120596. Al analizar la amplitud de estos eventos, se obtiene una única población homogénea de 10 pA, tanto como para eventos individuales como para *clusters* (figura I.12A).

Al registrar la actividad a nivel de canal único en células cotransfectadas con los ADNc de  $\alpha 7$  y  $\alpha 7LC$ , en vez de observarse la población homogénea de *clusters* de 10 pA que es detectada para el receptor  $\alpha 7$ , se observaron eventos de

diferentes amplitudes, que pueden ser agrupados en clases discretas. En el histograma correspondiente, estos grupos fueron distinguidos como poblaciones de aproximadamente 2, 4, 6, 8 y 10 pA (figura I.12C).

Teniendo en cuenta todas las posibles configuraciones de los heteropentámeros que pueden formarse, la población de 8 pA corresponde a aquellos receptores que poseen una subunidad de  $\alpha 7$ LC, formando un



**Figura I.12** Los registros de la izquierda muestran corrientes de canal único obtenidas en la configuración *single-channel*, producidas por la activación de los receptores mediante ACh 100  $\mu$ M y PNU-120596 1  $\mu$ M. A. El receptor  $\alpha 7$  produce eventos de 10 pA de amplitud. B. Las aperturas individuales de los receptores homopentaméricos  $\alpha 7$ LC no pueden ser detectadas. C. La combinación de las subunidades  $\alpha 7$  y  $\alpha 7$ LC produce eventos de distinta amplitud, reporteras de la estequiometría del receptor que generó dicho evento, que pueden ser agrupados en clases discretas. Las líneas punteadas de distinto color indican las amplitudes. A la derecha se muestran histogramas de amplitudes típicos para un registro con los ajustes de población en el color correspondiente con las líneas punteadas, construídos con eventos de duración igual o mayor a 1 ms. Potencial de membrana: -70 mV.

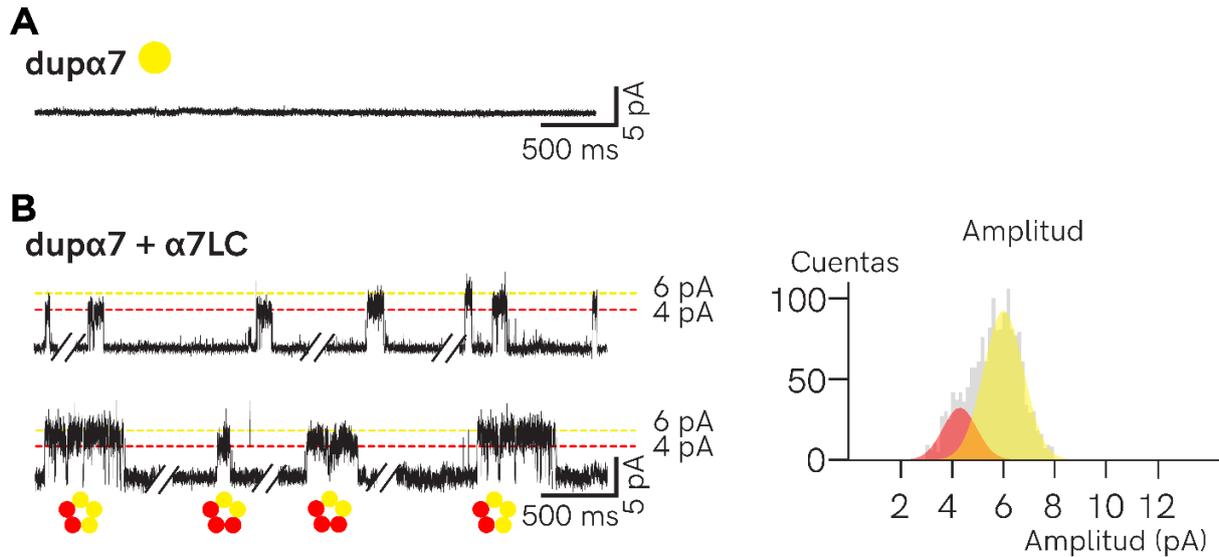
heteropentámero de cuatro subunidades  $\alpha 7$  y una subunidad  $\alpha 7LC$ ; la población de 6 pA corresponde a aquellos receptores poseen dos subunidades de  $\alpha 7LC$ , formando un heteropentámero de tres subunidades  $\alpha 7$  y dos subunidades  $\alpha 7LC$ ; etcétera. Es decir, cada subunidad de  $\alpha 7LC$  que se incorpora al heteropentámero resta 2 pA a la amplitud total de los eventos generados por el receptor  $\alpha 7$ . Por lo tanto, la amplitud de cada evento revela la estequiometría del heteropentámero que dio origen a dicho evento. Esta es la base de la estrategia *electrical fingerprinting* que utiliza la amplitud como reportera de estequiometría.

Para detectar el número de poblaciones se utilizó el algoritmo *X-means*. Un dato importante es que no todas las poblaciones fueron detectadas en todos los registros.

Para determinar la presencia de receptores  $\alpha 7/dup\alpha 7$  se realizó la misma estrategia cotransfectando  $\alpha 7LC$  y  $dup\alpha 7$ , dado que esta última subunidad conserva los aminoácidos de alta conductancia de  $\alpha 7$ . Como se describió anteriormente, no se detectan *clusters* en células transfectadas con ADNc de  $\alpha 7LC$  o  $dup\alpha 7$  en presencia de ACh y PNU-120596 1  $\mu M$  (figura I.13A).

Sin embargo, cuando se cotransfectaron los ADNc de  $\alpha 7LC$  y  $dup\alpha 7$ , fueron detectados *clusters* de diferentes amplitudes empleando proporciones molares de ADNc  $\alpha 7LC:dup\alpha 7$  1:3, 1:4 y 1:6 (figura I.13B). Este resultado indica inequívocamente que  $dup\alpha 7$  se ensambla junto con  $\alpha 7$  para formar receptores funcionales activables mediante su agonista natural.

Un dato importante es que la frecuencia de parches con actividad fue mucho más baja que la observada para la combinación  $\alpha 7LC/\alpha 7$ . Bajo las mismas

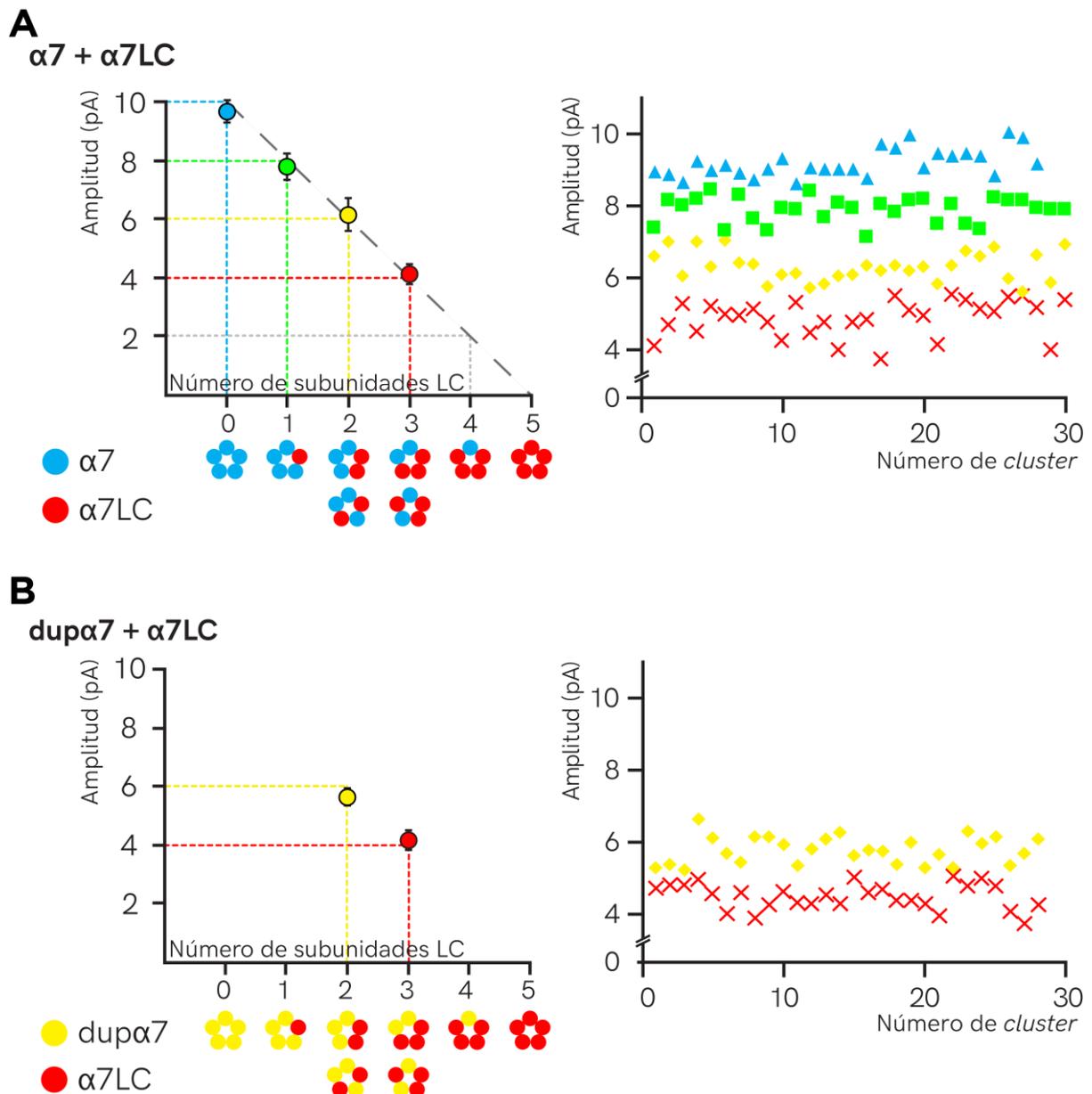


**Figura I.13** Los registros de la izquierda muestran corrientes de canal único obtenidas en la configuración *single-channel*, producidas por la activación de los receptores mediante ACh 100  $\mu$ M y PNU-120596 1  $\mu$ M. A. No se registran eventos cuando se transfecta dup $\alpha$ 7 B. La combinación de las subunidades dup $\alpha$ 7/ $\alpha$ 7LC produce eventos de 4 y 6 pA de amplitud. Las líneas punteadas de distinto color indican las amplitudes. A la derecha se muestra el histograma de amplitud típico para un registro con los ajustes de población en el color correspondiente con las líneas punteadas, construido con eventos de duración igual o mayor a 1 ms. Potencial de membrana: -70 mV.

condiciones de transfección, solo el 31% de los parches mostraron actividad de canal único en células cotransfectadas con los ADNc de  $\alpha$ 7LC y dup $\alpha$ 7 (53 de 171 parches) mientras que este porcentaje se incrementa a alrededor del 80% en células cotransfectadas con ADNc de  $\alpha$ 7LC y  $\alpha$ 7.

El análisis de las amplitudes de los *clusters* obtenidos de registros de células transfectadas con la combinación  $\alpha$ 7LC/dup $\alpha$ 7 en diferentes relaciones mostró dos clases predominantes, cuyos valores de amplitud media fueron de  $4,2 \pm 0,3$  pA y  $5,8 \pm 0,5$  pA (figura I.14). En estos registros no analizamos la población de menor amplitud, de 2 pA, que correspondería a receptores conteniendo una única subunidad de dup $\alpha$ 7, ya que los canales con esta estequiometría son mejor detectados utilizando la combinación reversa de subunidades ( $\alpha$ 7/dup $\alpha$ 7LC), como se muestra más adelante. Por otra parte, en un 27% de los parches, se detectó una

pequeña cantidad de *clusters* de mayor amplitud (~8 pA) cuyo origen sigue siendo desconocido.

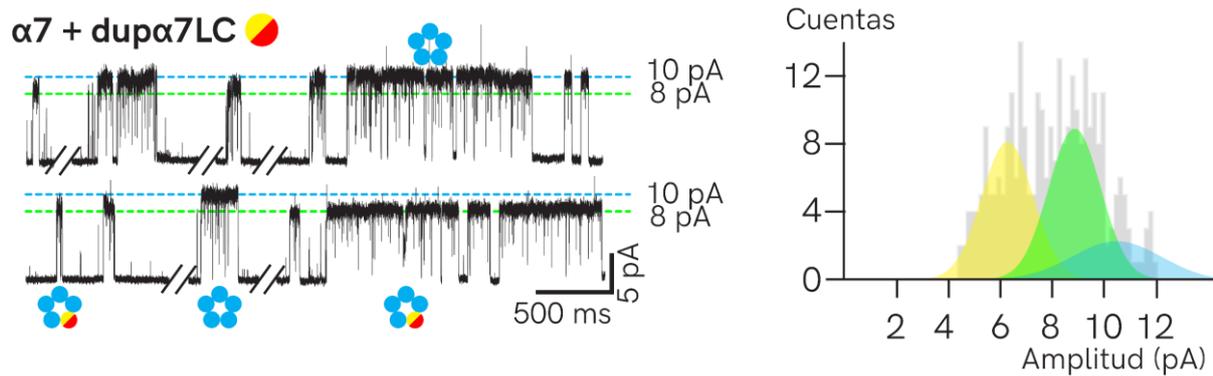


**Figura I.14** Análisis de las clases de amplitudes para células transfectadas con los ADNc de  $\alpha 7LC$  y  $\alpha 7$  (A) o  $\alpha 7LC$  y  $dup\alpha 7$  (B). A. *Izquierda*: gráfico de amplitud de corriente media versus número de subunidades LC en el arreglo del heteropentámero para la combinación  $\alpha 7/\alpha 7LC$ . La pendiente ajustada por el método de los mínimos cuadrados corresponde a  $-1,8 \pm 0,06$  pA/subunidad LC en el arreglo del heteropentámero, con un  $n=5$  para la clase de amplitud de 10 pA,  $n=10$  para las clases de amplitud de 8 y 6 pA, y  $n=8$  para la clase de amplitud de 4 pA. B. *Izquierda*: gráfico de amplitud de corriente media versus número de subunidades LC en el arreglo del heteropentámero para la combinación  $dup\alpha 7/\alpha 7LC$ . La pendiente ajustada por el método de los mínimos cuadrados corresponde a  $-1,63 \pm 0,3$  pA/subunidad LC en el arreglo del heteropentámero, con  $n=15$  para la clase de amplitud de 6 pA y  $n=3$  para la clase de amplitud de 4 pA. Los datos se presentan como la media  $\pm$  desvío estándar en todos los casos. A y B, *derecha*: gráficos de puntos representativos mostrando la distribución de *clusters* en función de su amplitud media; cada gráfico corresponde a un único registro, y cada punto a un *cluster* individual.

Dado que dup $\alpha$ 7 conserva los residuos aminoacídicos responsables de la conductancia de  $\alpha$ 7, puede inferirse que la relación entre la amplitud media de cada clase y la estequiometría del receptor es la misma para dup $\alpha$ 7/ $\alpha$ 7LC que para  $\alpha$ 7/ $\alpha$ 7LC. Por lo tanto, podemos asegurar que las poblaciones de 6 y 4 pA detectadas en la combinación dup $\alpha$ 7/ $\alpha$ 7LC corresponden a receptores heteroméricos que contienen tres y dos subunidades de dup $\alpha$ 7, respectivamente.

Para determinar si los receptores heteroméricos que contienen solo una subunidad de dup $\alpha$ 7 son funcionales, y como forma de confirmación de que los tres aminoácidos en la región intracelular mencionados anteriormente gobiernan la amplitud de los eventos detectados, se introdujo la triple mutación (RRR) en dup $\alpha$ 7 para generar la subunidad dup $\alpha$ 7 de baja conductancia, dup $\alpha$ 7LC (dup $\alpha$ 7 *low conductance*). Luego se transfectaron células BOSC 23 con la combinación  $\alpha$ 7/dup $\alpha$ 7LC, en una proporción de ADNc 1:8  $\alpha$ 7:dup $\alpha$ 7LC. Esta proporción fue utilizada para favorecer la incorporación de subunidades de dup $\alpha$ 7LC en los hétéropentámeros y disminuir la formación de homopentámeros de  $\alpha$ 7. Sobre estas células se realizaron registros de canal único en presencia de ACh 100  $\mu$ M y PNU-120596 1  $\mu$ M.

La amplitud de la mayoría de los *clusters* en todos los parches activos fue de aproximadamente 10 pA, la que corresponde a los receptores  $\alpha$ 7 homoméricos, indicando la prevalencia de este receptor por sobre la de heterómeros. De todos modos, fue posible distinguir *clusters* de amplitudes más bajas, que no fueron detectados en células transfectadas sólo con la subunidad  $\alpha$ 7 (figura I.16, izquierda).



**Figura I.16** Izquierda: corriente de canal único obtenida en la configuración *single-channel*, producida por la activación de los receptores mediante ACh 100  $\mu$ M y PNU-120596 1  $\mu$ M. Al igual que para el caso de la combinación dup $\alpha$ 7/ $\alpha$ 7LC, la combinación «reversa» de subunidades,  $\alpha$ 7/dup $\alpha$ 7LC produce eventos de distintas amplitudes (10, 8 y 6 pA). Las líneas punteadas de distinto color indican las amplitudes. Derecha: histograma de amplitudes típico para un registro con los ajustes de población en el color correspondiente con las líneas punteadas, construido con eventos de duración igual o mayor a 1 ms. Potencial de membrana: -70 mV.

El análisis de los histogramas de amplitud de los *clusters* permitió agruparlos en poblaciones de  $\sim$ 10, 8 y 6 pA, que corresponden a receptores que no contienen ninguna subunidad dup $\alpha$ 7, y que contienen una y dos subunidades dup $\alpha$ 7, respectivamente (figura I.16, derecha). En estos experimentos no analizamos poblaciones de menor amplitud, ya que las poblaciones correspondientes fueron correctamente detectadas con la combinación reversa mostrada anteriormente (dup $\alpha$ 7/ $\alpha$ 7LC).

**Por lo tanto, la aplicación de la técnica de *electrical fingerprinting* reveló que dup $\alpha$ 7 puede ensamblarse con  $\alpha$ 7 formando receptores heteroméricos funcionales, y que estos pueden contener una, dos o tres subunidades de dup $\alpha$ 7.**

## **ARREGLO DE SUBUNIDADES DE LOS RECEPTORES HETEROMÉRICOS $\alpha$ 7/DUP $\alpha$ 7**

El sitio de unión de ACh en el receptor  $\alpha$ 7 está localizado en las interfases entre

subunidades, formado por una cara principal y una complementaria, como se describió en la introducción de esta tesis. Se ha demostrado que una tirosina conservada (Y93) localizada en el *loop* A de la cara principal del sitio de unión es esencial para la activación del canal mediante ACh (Puskar *et al.*, 2011). Dado que la subunidad dup $\alpha$ 7 carece de Y93, es esperable que no pueda contribuir con una cara principal para formar el sitio de unión.

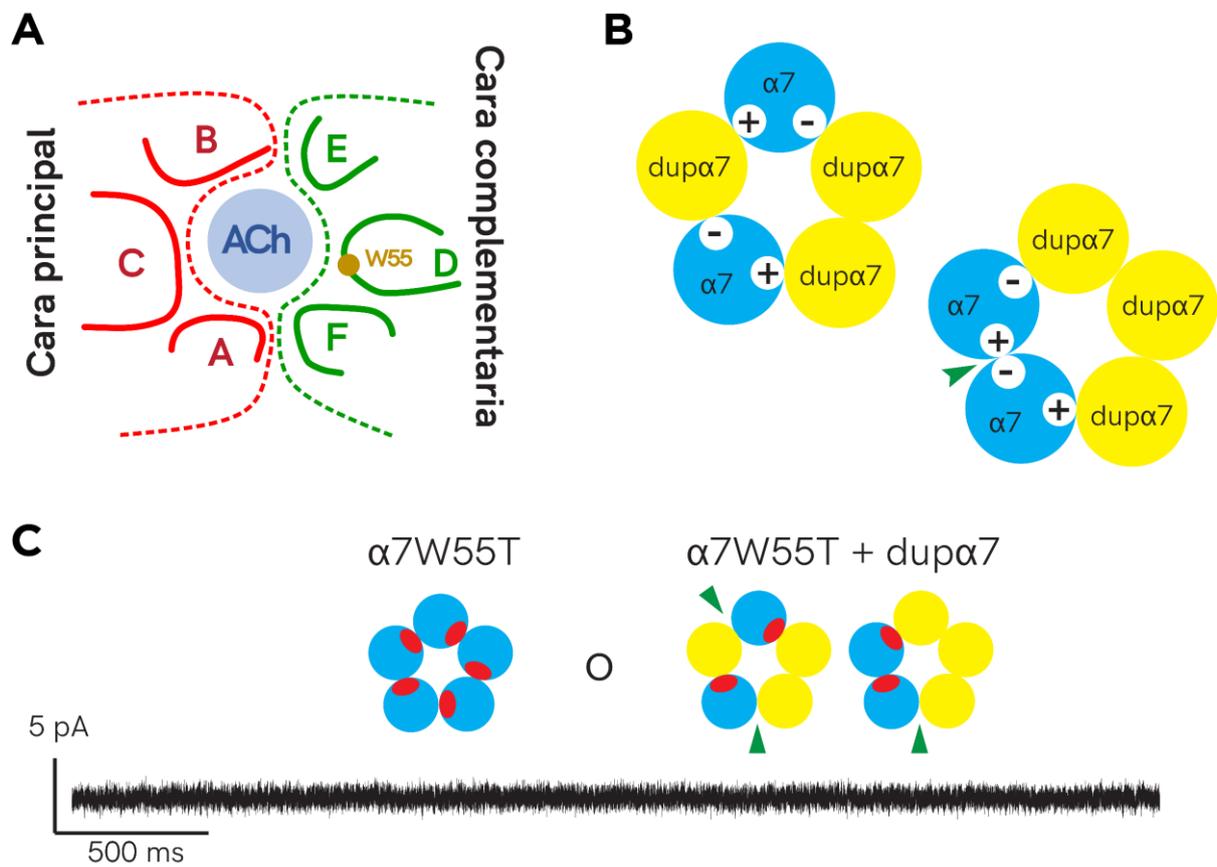
Para comprobar si era posible que la subunidad dup $\alpha$ 7 formara la cara complementaria del sitio de unión, a pesar de carecer del *loop* D, se empleó la subunidad mutante de  $\alpha$ 7  $\alpha$ 7W55T. Esta posee una mutación en el *loop* D del sitio de unión de ACh, intercambiando el triptófano 55 (figura I.17A) por una treonina. El W55 es esencial para la activación del receptor  $\alpha$ 7 (Rayes *et al.*, 2009; Andersen *et al.*, 2013).

Existen dos posibles arreglos pentaméricos que contengan tres subunidades dup $\alpha$ 7 y dos subunidades  $\alpha$ 7, dependiendo de si las dos subunidades de se encuentran adyacentes o no (figura I.17B). Si las dos subunidades  $\alpha$ 7 no fueran consecutivas, la activación ocurriría a través de la interfase  $\alpha$ 7/dup $\alpha$ 7, donde la subunidad dup $\alpha$ 7 debería proveer una cara complementaria para el sitio de unión de ACh. Para probar esta hipótesis, se co-expresó la subunidad dup $\alpha$ 7 junto con la subunidad mutante  $\alpha$ 7W55T.

Se ha demostrado previamente en nuestro laboratorio que ACh no provoca respuestas a nivel de canal único o de corrientes macroscópicas para células que expresan receptores formados únicamente por subunidades  $\alpha$ 7W55T (Rayes *et al.*, 2009; Andersen *et al.*, 2013).

Se realizaron registros sobre células BOSC 23 transfectadas con ADNc de la combinación  $\alpha 7W55T/dup\alpha 7$ , en una proporción molar de 1:3 y 3:1. Al igual que lo observado para  $\alpha 7W55T$ , no se detectaron eventos de apertura en presencia de ACh 100  $\mu M$  con PNU-120596. Estos resultados indican que la cara complementaria del sitio de unión de ACh tiene que ser proporcionada indefectiblemente por la subunidad  $\alpha 7$  para permitir la activación del canal.

Por lo tanto, la activación de los receptores heteroméricos  $\alpha 7/dup\alpha 7$  ocurre a través del sitio entre la interfase de las dos subunidades  $\alpha 7$  adyacentes y, en



**Figura 1.17** A. Diagrama del sitio de unión de ACh en  $\alpha 7$  destacando la ubicación del W55, esencial para la activación del receptor. B. Posibles arreglos de las subunidades en el heteropentámero conteniendo tres subunidades  $dup\alpha 7$  y dos  $\alpha 7$ . La flecha indica el sitio de unión de ACh funcional en la interfase entre subunidades  $\alpha 7$ . C. Registro de *patch clamp* en la configuración *single-channel* representativo, en la presencia de ACh 100  $\mu M$  y PNU 1  $\mu M$ , que muestra la falta de actividad de canal en células transfectadas con los ADNc de  $\alpha 7W55T$  o  $\alpha 7W55T$  y  $dup\alpha 7$  en conjunto. Las flechas indican sitios posibles de unión de ACh en los que la cara complementaria sería aportada por la subunidad  $dup\alpha 7$ . Potencial de membrana: -70 mV.

consecuencia, en el pentámero  $(\alpha 7)_2(\text{dup}\alpha 7)_3$ , las dos subunidades  $\alpha 7$  se encuentran localizadas consecutivamente.

Finalmente, se comparó la cinética de los pentámeros  $(\alpha 7)_2(\text{dup}\alpha 7)_3$  con la de  $(\alpha 7)_5$  empleando ACh 100  $\mu\text{M}$  en la presencia de PNU-120596 1  $\mu\text{M}$ . Para ello, se analizó la población de 6 pA de amplitud en los registros de células que expresaban  $\alpha 7\text{LC}$  y  $\text{dup}\alpha 7$ , que corresponde a receptores que contienen 3 subunidades de  $\text{dup}\alpha 7$ . Se halló que la duración media del componente de apertura más lento y la duración media del *cluster* no fueron significativamente diferentes de la del receptor  $\alpha 7$  o de la de los receptores heteropentaméricos  $(\alpha 7)_2(\alpha 7\text{LC})_3$ , esta última obtenida de la población de 6 pA de la combinación  $\alpha 7/\alpha 7\text{LC}$  (tabla I.1). Este análisis indica que, en los heteropentámeros  $\alpha 7/\text{dup}\alpha 7$ , la subunidad truncada incorporada no altera la cinética de los receptores potenciados.

Combinación de subunidades	Receptor	Clase de amplitud (pA)	<i>Open</i> (ms)	<i>Cluster</i> (ms)	n
$\alpha 7$	$(\alpha 7)_5$	$9,8 \pm 1,7$	$72 \pm 41$	$1952 \pm 548$	5
$\alpha 7\text{LC}/\alpha 7$ (1:4)	$(\alpha 7\text{LC})_2(\alpha 7)_3$	$6,1 \pm 0,4$	$63 \pm 25$	$1794 \pm 1140$	7
$\alpha 7\text{LC}/\text{dup}\alpha 7$ (1:3)	$(\alpha 7\text{LC})_2(\text{dup}\alpha 7)_3$	$5,8 \pm 0,5$	$93 \pm 40$	$2195 \pm 754$	11

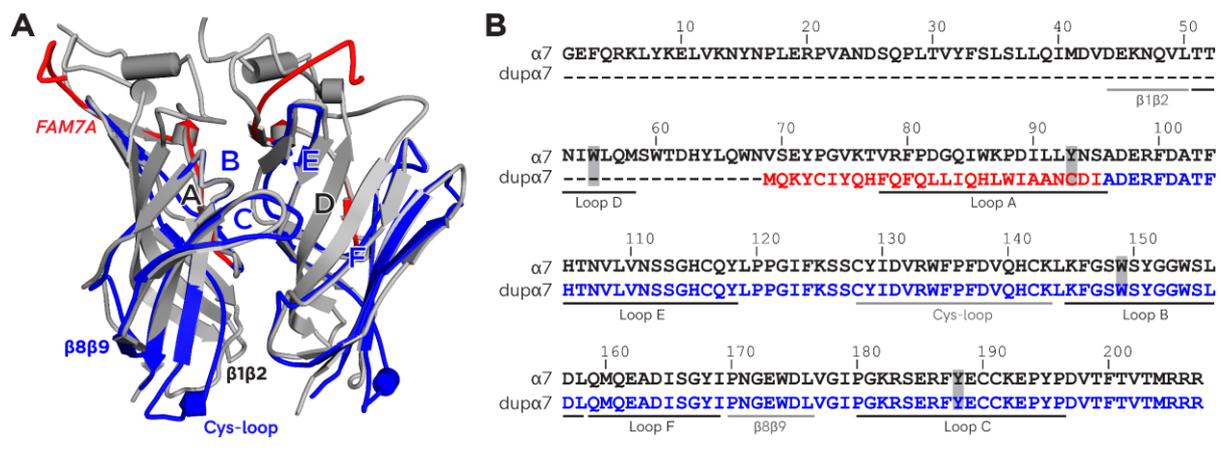
**Tabla I.1** Propiedades cinéticas de los receptores  $\alpha 7$  y  $\alpha 7/\text{dup}\alpha 7$ . Los canales fueron activados por ACh 100  $\mu\text{M}$  en la presencia de PNU-120596 1  $\mu\text{M}$ . Las diferencias de duraciones entre todos los receptores no fueron estadísticamente significativas (análisis de varianza,  $p=0,23$  para *open* y  $p=0,62$  para *cluster*).

## MODELADO MOLECULAR

Para entender por qué la subunidad truncada  $\text{dup}\alpha 7$  no puede formar canales funcionales, se la modeló utilizando el servidor I-TASSER. El modelo estructural

de la subunidad  $\alpha 7$  humana fue creado mediante modelado por homología basado en la estructura de la quimera  $\alpha 7$ -AChBP (código PDB: 5AFM); en cambio, el modelado 3D de dup $\alpha 7$  fue generado mediante el servidor I-TASSER.

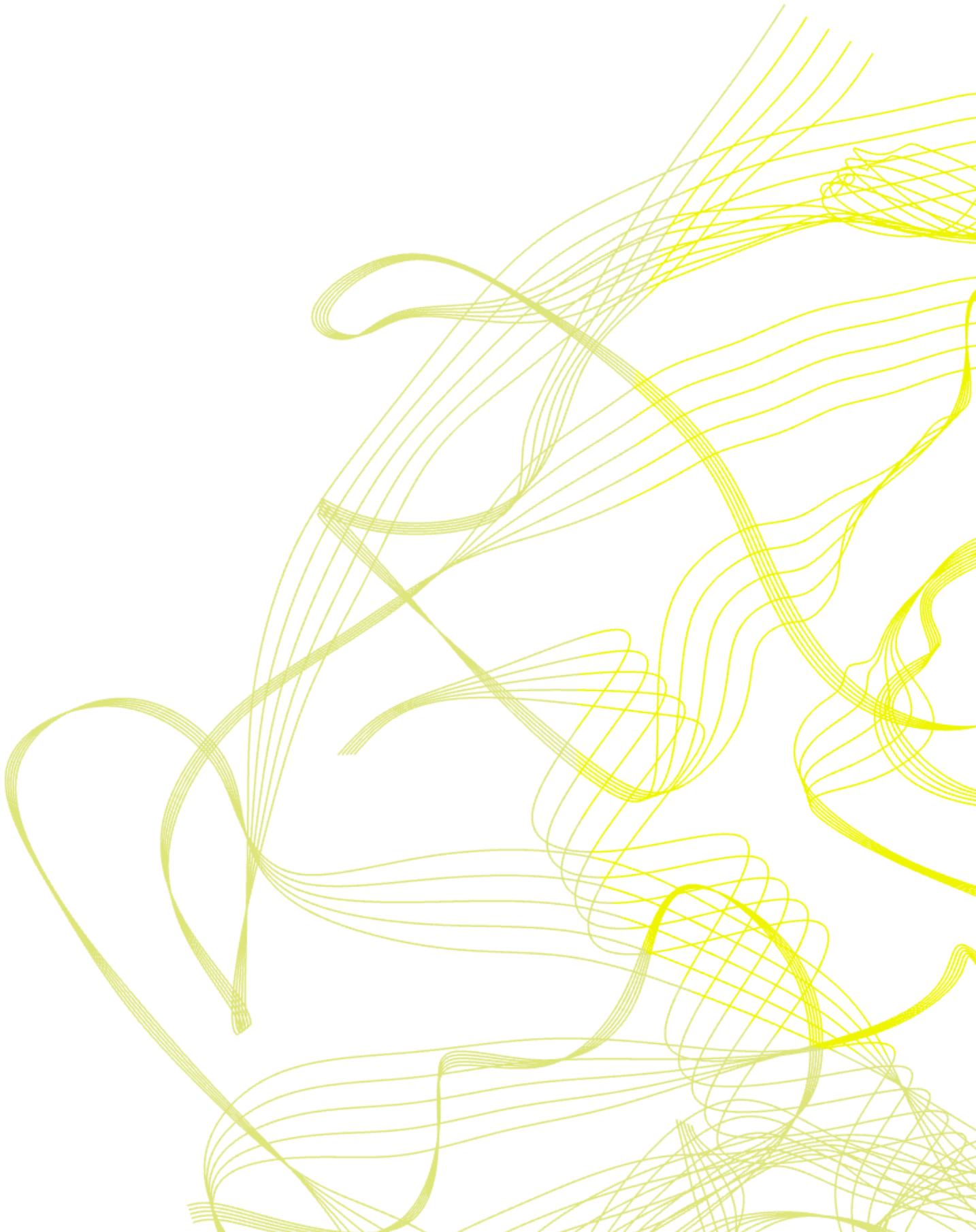
dup $\alpha 7$  carece de los *loops* A y D del sitio de unión del agonista. Sorpresivamente, en el modelado molecular de la subunidad, la secuencia que corresponde al péptido FAM7A se superpuso con el *loop* A en el modelo estructural de  $\alpha 7$ . A pesar de esto, la región FAM7A no posee el aminoácido tirosina 93, como tampoco el *loop* D en la cara complementaria del sitio de unión del agonista ni el *loop*  $\beta_1$ - $\beta_2$  en la región de acoplamiento.



**Figura 1.18** Modelos moleculares superpuestos para las subunidades dup $\alpha 7$  y  $\alpha 7$ . A. Alineamiento estructural de los dominios extracelulares de dos subunidades adyacentes  $\alpha 7/\alpha 7$  y dup $\alpha 7$ /dup $\alpha 7$ . Las subunidades  $\alpha 7$  se muestran en gris. En las subunidades dup $\alpha 7$  las regiones correspondientes a FAM7A se muestran en rojo, y las correspondientes a CHRNA7 en azul. Los *loops* del sitio de unión de ACh y de la interfase presentes en ambas moléculas se indican con letras azules y los que se encuentran presentes solo en  $\alpha 7$  se indican con letras negras. B. Alineamiento de las secuencias de  $\alpha 7$  y dup $\alpha 7$  (números de acceso CAD88995 y NP\_647536 respectivamente). La secuencia de  $\alpha 7$  no incluye el péptido señal. La secuencia de dup  $\alpha 7$  correspondiente a la región FAM7A se muestra en rojo. Los residuos para los seis *loops* del sitio de unión a ACh (A-F) y los *loops* de la región de acoplamiento se indican con líneas negras y grises, respectivamente. Los residuos aromáticos esenciales para la respuesta al agonista de  $\alpha 7$  se encuentran marcados con gris.

# DISCUSIÓN

## CAPÍTULO I



La expresión y función del receptor  $\alpha 7$  humano puede ser regulada en distintos puntos por diferentes mecanismos, como la regulación génica a través de mecanismos transcripcionales (Sinkus *et al.*, 2015), expresión conjunta de proteínas chaperonas (Castillo *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2005; Gee *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2016), regulación en alta del receptor (Breese *et al.*, 1997), interacción con proteínas intracelulares (Kabbani *et al.*, 2013), y modulación alostérica por compuestos endógenos (Chimienti *et al.*, 2003).

En la presente tesis indagamos acerca de un nuevo mecanismo de modulación, el cual involucra la duplicación parcial del gen parental, un evento que es evolutivamente nuevo y específico de humanos (Locke *et al.*, 2005; Sinkus *et al.*, 2015), y cuya expresión resulta en una subunidad  $\alpha 7$  truncada, *dupa7*. El mecanismo detrás de esta modulación y el rol fisiológico de la subunidad *dupa7* aún sigue siendo desconocido.

Con el objetivo de dilucidar si la expresión de esta subunidad es capaz de modular la función del receptor  $\alpha 7$ , generamos el ADNc de *dupa7*, lo expresamos en células de mamífero y evaluamos el funcionamiento de los receptores mediante electrofisiología, a nivel de canal único y corrientes macroscópicas.

Nuestros resultados revelaron que: **(i) la subunidad *dupa7* por sí sola no forma canales iónicos funcionales; (ii) la subunidad *dupa7* puede ensamblarse con la subunidad  $\alpha 7$  formando receptores heteroméricos  $\alpha 7$ /*dupa7*; (iii) se requieren al menos dos subunidades  $\alpha 7$  presentes en los receptores heteroméricos  $\alpha 7$ /*dupa7* para que estos sean funcionales; (iv) la activación de receptores heteroméricos requiere un sitio de unión en**

**las interfases  $\alpha 7/\alpha 7$ ; y (v), la cinética de los receptores heteroméricos  $\alpha 7/\text{dup}\alpha 7$  potenciados es la misma que para los homopentámeros  $(\alpha 7)_5$ .**

El uso de un anticuerpo dirigido contra el *loop* intracelular de  $\alpha 7$  para realizar los estudios de *Western blot*, que es conservado entre las subunidades  $\alpha 7$  y  $\text{dup}\alpha 7$ , mostró que el ADNc de  $\text{dup}\alpha 7$  es capaz de traducirse en células BOSC 23. No se detectó unión de  $\alpha$ -Btx en células transfectadas con el ADNc de  $\text{dup}\alpha 7$ , el cual depende de la disponibilidad de sitios de unión para la toxina (el mismo sitio de unión que para ACh), de acuerdo con resultados reportados anteriormente en ovocitos (de Lucas-Cerrillo *et al.*, 2011). La expresión heteróloga de homómeros de  $\text{dup}\alpha 7$  en la línea celular de rata GH4C1 como también en ovocitos había sido detectada anteriormente utilizando un anticuerpo anti- $\alpha 7$ , resaltando que la proteína parecía estar en una localización más interna que la de  $\alpha 7$ , probablemente en el retículo endoplasmático (de Lucas-Cerrillo *et al.*, 2011). A pesar de que la ausencia del péptido señal de la subunidad truncada sugiere una localización subcelular, todavía se desconoce si existen homopentámeros de  $\text{dup}\alpha 7$  en la superficie celular. Es importante destacar aquí que todavía no está disponible un anticuerpo que sea  $\text{dup}\alpha 7$  específico, lo que facilitaría su detección y aumentaría la especificidad en la identificación. Nuestros resultados demostraron que no hay receptores  $\text{dup}\alpha 7$  funcionales, pero no pueden descartar que estén presentes sin ser funcionales.

En estudios previos se demostró que la presencia de  $\text{dup}\alpha 7$  reduce significativamente el número de receptores  $\alpha 7$  en ovocitos (de Lucas-Cerrillo *et al.*, 2011) pero no en células neuronales (Wang *et al.*, 2014). En este último sistema, se reportó pobre traducción de  $\text{dup}\alpha 7$ . En nuestro sistema utilizamos una cantidad

3 veces mayor de ADNc de dup $\alpha$ 7 que de  $\alpha$ 7 para favorecer la expresión de dup $\alpha$ 7 por sobre la de  $\alpha$ 7, lo que redujo la unión de  $\alpha$ -Btx en la membrana celular. Somos conscientes de que el nivel de reducción de fluorescencia dado por la presencia de dup $\alpha$ 7 no puede ser exactamente determinado debido a un posible sesgo introducido durante la selección manual de las células fluorescentes. Además, solo analizamos células que poseían algún nivel de fluorescencia en su membrana. De todos modos, asumiendo que la traducción y ensamblado son similares entre  $\alpha$ 7 y dup $\alpha$ 7, la distribución binomial indica que el 23% de los receptores deberían ser homómeros de dup $\alpha$ 7, y el 39,5% deberían contener solo una subunidad de  $\alpha$ 7 en células transfectadas con una proporción de ADNc de  $\alpha$ 7:dup $\alpha$ 7 1:3. Bajo estas condiciones, una reducción importante en la unión de  $\alpha$ -Btx debería ocurrir, ya que más del 60% de los receptores no serían capaces de unir  $\alpha$ -Btx por carecer de sitios de unión para la misma y, además, gran parte del resto contendría un reducido número de sitios de unión.

A causa de que la subunidad dup $\alpha$ 7 podría tener baja eficiencia en su ensamblado o expresión en superficie en receptores heteroméricos, para las combinaciones  $\alpha$ 7LC:dup $\alpha$ 7 y  $\alpha$ 7:dup $\alpha$ 7LC las proporciones molares de los plásmidos de las subunidades incluidas en la transfección abarcaron un rango de entre 1:3 a 1:10. De esta manera, aumentamos la probabilidad de que se produzca la incorporación de subunidades dup $\alpha$ 7 en el receptor heteromérico. A pesar de que la proporción de ADNc de subunidades no es directamente proporcional a la estequiometría del receptor final que se expresa en la superficie celular, es esperable que un exceso de una subunidad con respecto a otra pueda compensar en parte la deficiencia en la traducción o ensamblado y sesgar la población de

receptores hacia pentámeros que incorporen la subunidad deseada.

A pesar de que utilizamos Ric-3 y NACHO como chaperonas, sus acciones sobre *dupa7*, así como la proporción óptima de ADNc de  $\alpha 7$  con respecto al de las chaperonas sigue siendo desconocida. Además, la expresión de *dupa7* parece depender del tipo celular. Por ejemplo, en neuronas la proporción de ARNm *dupa7*: $\alpha 7$  es la opuesta a la de las células inmunes, siendo *dupa7* el producto principal en las últimas (Costantini *et al.*, 2015). Por lo tanto, el efecto modulador negativo de *dupa7* sobre  $\alpha 7$  observado en el sistema heterólogo utilizado podría no ser extrapolado directamente a todos los sistemas nativos.

Las células que expresaron *dupa7* en ausencia de  $\alpha 7$  no mostraron ninguna actividad detectable a nivel de canal único generada por ACh en la presencia del potente PAM PNU-120596. Este resultado apoya el consenso de que la subunidad *dupa7* no forma receptores homoméricos funcionales en ovocitos y células de mamífero. Una hipótesis a favor de la ausencia de respuesta es la falta de un sitio intacto para la unión de ACh. Para superar esto, utilizamos un ligando alostérico, el 4BP-TQS, que se une a una región transmembrana conservada entre  $\alpha 7$  y *dupa7*. Este ligando provoca una marcada respuesta en el receptor  $\alpha 7$ , pero no se observó respuesta, tanto a nivel de canal único como de corrientes macroscópicas, en células que expresaban *dupa7*. Estos resultados confirman la ausencia de receptores *dupa7* funcionales, lo que podría ser producto de la ausencia de homopentámeros de *dupa7* en la membrana; o, si estos estuvieran presentes, de una incapacidad de funcionar como canal iónico activable por las vías ensayadas en esta tesis.

El modelado de la subunidad dup $\alpha$ 7 mostró que la secuencia FAM7A se corresponde con el *loop A* de la subunidad  $\alpha$ 7. Sin embargo, el modelo muestra varios cambios estructurales, tanto en la cara principal como en la complementaria del sitio de unión del agonista, que sugieren la incapacidad de la subunidad dup $\alpha$ 7 para responder al ligando. Las principales diferencias de dup $\alpha$ 7 con respecto a la subunidad  $\alpha$ 7 fueron: i) dup $\alpha$ 7 carece del aminoácido tirosina 93, residuo de la cara principal fundamental para la activación del receptor  $\alpha$ 7; ii) dup $\alpha$ 7 carece del *loop D* en la cara complementaria, lo que provoca la ausencia de un triptófano importante para la activación del receptor  $\alpha$ 7 (W55); y iii) dup $\alpha$ 7 carece del *loop*  $\beta$ 1- $\beta$ 2, estructura esencial para la activación en otros miembros de la familia de receptores (Bouzat *et al.*, 2008), localizado en la región de acoplamiento. En conjunto, estos resultados sugieren que, de poder formarse, un receptor homopentamérico formado por subunidades dup $\alpha$ 7 no sería funcional.

La estrategia de *electrical fingerprinting* ha sido utilizada ampliamente en nuestro y otros laboratorios para determinar la estequiometría funcional de receptores que contienen la subunidad  $\alpha$ 7. Esta estrategia requiere la medición precisa de la amplitud de los eventos presentes en los registros de canal único, la que actúa como reportera de la estequiometría del receptor que originó ese evento, ya sea una apertura unitaria o un *cluster*. Dada la breve duración del estado abierto del receptor  $\alpha$ 7, la estrategia requiere ser realizada en la presencia de un PAM que, mediante el incremento de la duración de estado abierto, permita la resolución completa de la amplitud del canal. Elegimos el PNU-120596 porque se une a un sitio que es conservado entre las subunidades  $\alpha$ 7 y dup $\alpha$ 7 y al mismo tiempo incrementa enormemente la probabilidad de apertura, facilitando la

detección funcional de receptores de baja expresión.

La subunidad  $\alpha 7LC$  posee una triple mutación en determinantes de la conductancia del canal, que están localizados en el *loop* entre los segmentos transmembrana M3 y M4 en la porción intracelular del receptor. La mutación triple no afecta a la cinética del receptor  $\alpha 7$ , pero sí a la amplitud de los eventos unitarios, la que se reduce a niveles indetectables en registros de canal único. Como se describió previamente, cuando la subunidad  $\alpha 7LC$  es coexpresada con la subunidad  $\alpha 7$ , múltiples y discretas clases de amplitud son detectadas en registros de canal único, cada una correspondiente a una población diferente de receptores con un número fijo de subunidades de baja conductancia. Cuando  $\text{dup}\alpha 7$  fue coexpresada con  $\alpha 7LC$ , se detectaron *clusters* de diferentes amplitudes activados por ACh en presencia de PNU-120596. Este resultado inequívocamente indica la presencia de receptores de superficie heteroméricos  $\alpha 7/\text{dup}\alpha 7$  funcionales dado que no se detectó actividad de canal cuando se transfectó cualquiera de las dos subunidades por separado. La aplicación de la estrategia de *electrical fingerprinting* reveló que la subunidad  $\text{dup}\alpha 7$  puede ensamblarse con la subunidad  $\alpha 7$  para formar receptores heteroméricos funcionales que contengan una, dos o tres subunidades  $\text{dup}\alpha 7$ .

Dado que el *loop* A de  $\alpha 7$  posee una tirosina clave (Y93) que está ausente en  $\text{dup}\alpha 7$ , inferimos que en los heterómeros  $\alpha 7/\text{dup}\alpha 7$  la subunidad  $\alpha 7$  debe proveer la cara principal del sitio de unión al agonista. La falta de respuestas funcionales de células que expresan las subunidades  $\text{dup}\alpha 7$  y  $\alpha 7W55T$ , la que no es capaz de aportar una cara complementaria funcional del sitio de unión, indica que esta cara debe también ser provista por la subunidad  $\alpha 7$ . Por lo tanto, en los receptores

$(\alpha 7)_2(\text{dup}\alpha 7)_3$ , las dos subunidades de  $\alpha 7$  deben ser adyacentes, y la activación del receptor ocurre a través de la unión al sitio de agonistas formado entre dichas subunidades. El hecho de que  $(\alpha 7)_2(\text{dup}\alpha 7)_3$  pueda ser activado a pesar de solo poseer un sitio de unión al agonista intacto se encuentra en concordancia con resultados previos de nuestro laboratorio que demuestran que solo un sitio funcional para la unión de ACh al receptor  $\alpha 7$  es suficiente para su activación, y que los restantes sitios aumentan su sensibilidad a la ACh (Andersen *et al.*, 2013). También se encuentra de acuerdo con los hallazgos para el receptor  $\alpha 7\beta 2$  que muestran que su activación ocurre a través de la interfase  $\alpha 7/\alpha 7$  (Murray *et al.*, 2012; Nielsen *et al.*, 2018). Por lo tanto, es necesario que por lo menos exista un sitio en una interfase  $\alpha 7/\alpha 7$  para la activación de los receptores heteroméricos.

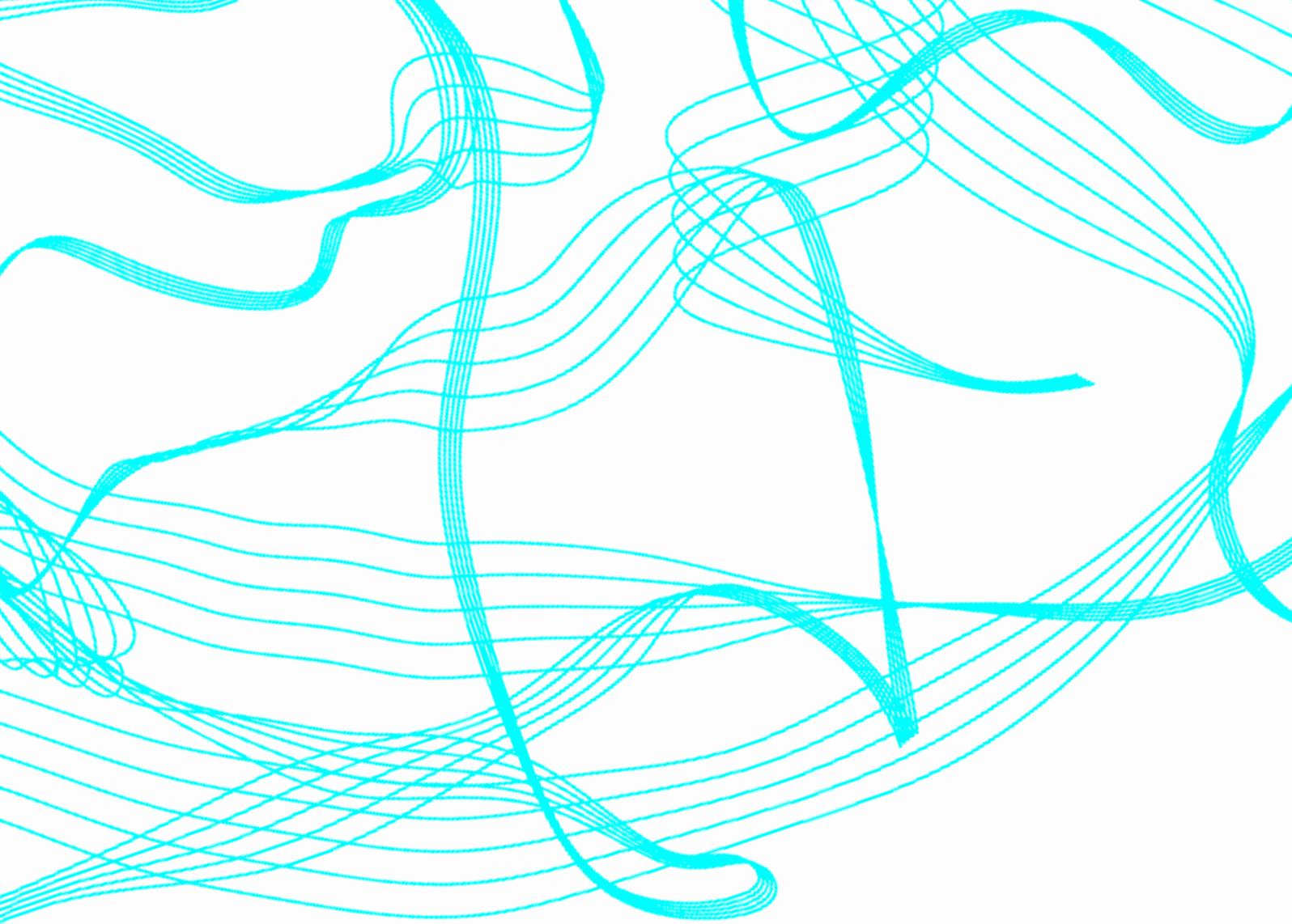
Además, mostramos que las duraciones medias de las aperturas y *clusters* de  $(\alpha 7)_2(\text{dup}\alpha 7)_3$  provocadas por ACh en la presencia de PNU-120596 son idénticas a aquellas de  $(\alpha 7)_5$ , indicando que, por lo menos en los receptores potenciados por PNU-120596, la cinética no está afectada por la presencia de  $\text{dup}\alpha 7$ . Desafortunadamente, esta estrategia no puede ser realizada en la ausencia de un potenciador dada la falta de resolución completa de la amplitud de las aperturas de los receptores en ese caso, y la baja frecuencia de los eventos de apertura (Bouzat y Sine, 2018).

En suma, nuestros resultados de electrofisiología predicen que **la subunidad  $\text{dup}\alpha 7$  opera funcionalmente como un modulador negativo de la actividad de  $\alpha 7$** . Los heterómeros que contienen cuatro subunidades  $\text{dup}\alpha 7$  no son funcionales, y los que poseen tres o menos subunidades  $\text{dup}\alpha 7$ , a pesar de ser funcionales, tienen sensibilidad a la ACh reducida dado su menor número de sitios

de unión al agonista activos (Andersen *et al.*, 2011, 2013). Una acción de modulación negativa adicional de dup $\alpha$ 7 podría estar asociada con la disminución del número de receptores de superficie  $\alpha$ 7 (de Lucas-Cerrillo *et al.*, 2011). De todos modos, esto podría diferir entre sistemas nativos y heterólogos dadas las diferencias en la expresión génica, translocación a superficie, ensamblaje de los canales o chaperonas. Por lo tanto, nuestros resultados alientan a explorar el ensamblaje de heterómeros en diferentes tejidos humanos.

Nuestro estudio se centró en las respuestas ionotrópicas. De todos modos, el receptor  $\alpha$ 7 ha demostrado actuar de manera dual ionotrópica/metabotrópica (Kabbani *et al.*, 2013; Corradi y Bouzat, 2016). Considerando que la transducción de señal independiente de  $\alpha$ 7 es importante en las respuestas antiinflamatorias y que las células del sistema inmune muestran alta expresión del receptor (Costantini *et al.*, 2015), sería interesante determinar si la actividad metabotrópica difiere entre receptores homoméricos y heteroméricos dup $\alpha$ 7/ $\alpha$ 7.

Desde un punto de vista molecular, nuestros hallazgos proveen información nueva con respecto a la activación única del receptor  $\alpha$ 7, y, desde un punto de vista fisiológico, ayudan a revelar el impacto aún desconocido de la subunidad truncada específica de humanos sobre su función.



## CAPÍTULO II

# **Modulación del receptor $\alpha 7$ por péptidos $\beta$ -Amiloide**

El aumento dramático de la expectativa de vida que se produjo en el siglo XX ha resultado en una cantidad cada vez mayor de individuos que llegan a la edad en la que los desórdenes neurodegenerativos poseen mayor prevalencia (Selkoe, 2001). La enfermedad de Alzheimer es la forma más común de demencia senil en el mundo, representando el 80% de los casos (Kumar *et al.*, 2015).

Esta enfermedad es compleja y multifactorial. A pesar de que han pasado más de 100 años desde la primera descripción de sus síntomas (Alzheimer, 1907), la etiología precisa sigue siendo desconocida, con excepción de un 1 a 5% de los casos en los que la presencia de factores genéticos se han identificado (Reitz y Mayeux, 2014). Los pacientes que sufren esta enfermedad presentan una demencia progresiva inexorable, que avanza insidiosamente desde un leve daño cognitivo a una total supresión de la habilidad de la persona para llevar a cabo las actividades diarias más simples. Histológicamente se caracteriza por la aparición en áreas vulnerables del cerebro (como el hipocampo y la corteza) de ovillos neurofibrilares de filamentos de la proteína asociada a microtúbulos Tau en su forma hiperfosforilada, placas neuríticas extracelulares de péptidos pequeños de distinto tamaño llamados  $\beta$ -Amiloides, e inflamación (Selkoe, 2001; Zhang *et al.*, 2011; Echeverria *et al.*, 2016).

Los péptidos  $\beta$ -Amiloides ( $\beta$ A) derivan de la proteína precursora amiloide (APP, *amyloid precursor protein*), cuyo gen está localizado en el cromosoma 21 en humanos. Esta es una proteína transmembrana que puede atravesar un complejo proceso de clivaje por diversas secretasas, dando lugar a una multitud de fragmentos biológicamente activos con funciones en el desarrollo del sistema nervioso central, formación y función de sinapsis y neuroprotección que están

comenzando a caracterizarse en la actualidad (Müller *et al.*, 2017).

Al sufrir un clivaje secuencial por las enzimas  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa, la APP deriva en los fragmentos peptídicos N-terminal sAPP $\beta$  (*soluble APP  $\beta$* ), el intermedio  $\beta$ -Amiloide, y el C-terminal AICD (*APP intracellular domain*). La enzima  $\gamma$ -secretasa puede realizar distintos cortes, produciendo principalmente  $\beta$ -Amiloide 1-40 ( $\beta$ A<sub>1-40</sub>), de 40 aminoácidos; y  $\beta$ -Amiloide 1-42 ( $\beta$ A<sub>1-42</sub>), de 42 aminoácidos. Este último representa solo el 10% del péptido producido, pero es más hidrofóbico y propenso a formar fibrillas (Zhang *et al.*, 2011).

En pacientes sanos existe un equilibrio entre la formación y degradación de  $\beta$ A, siendo las concentraciones fisiológicas del péptido en el cerebro del orden picomolar; en las personas con enfermedad de Alzheimer llega a concentraciones nanomolares (Dineley, 2007; Collins-Praino *et al.*, 2014; Puzzo *et al.*, 2015). La acumulación comienza con fracciones solubles de bajo peso molecular (monómeros, dímeros o trímeros) y continúa con fracciones de oligómeros de mayor peso o fibrillas insolubles (Sadigh-Eteghad *et al.*, 2014). La formación de estas últimas es un proceso complejo de varios pasos, que involucra la asociación de diferentes tipos de oligómeros no fibrilares, la posterior nucleación de agregados de protofibrillas sobre oligómeros solubles y la elongación y agrupamiento de las protofibrillas en fibrillas maduras (Ono *et al.*, 2009; Hayden y Teplow, 2013; Barz y Strodel, 2016; Sun *et al.*, 2017; Brännström *et al.*, 2018). Por lo tanto, muchas formas oligoméricas existen simultáneamente en un equilibrio dinámico (Sadigh-Eteghad *et al.*, 2014; Puzzo *et al.*, 2015).

Existe controversia sobre el papel del  $\beta$ A en la enfermedad de Alzheimer, y sobre su efecto en las neuronas. Si bien los cerebros de todas las personas que

sufrieron la enfermedad de Alzheimer poseen placas de  $\beta$ A, la mera presencia de las mismas no siempre se encuentra asociada al desarrollo de esta patología (McLean *et al.*, 1999; Nelson *et al.*, 2012). El hallazgo de placas de  $\beta$ A en cerebros *post mortem* de pacientes que no desarrollaron la enfermedad de Alzheimer se asoció con niveles muchos más bajos de formas oligoméricas de  $\beta$ A que los que se encontraron en los cerebros de personas que habían sufrido la enfermedad (Esparza *et al.*, 2013). Se ha reportado en la literatura tanto que las formas oligoméricas son tóxicas (Harrigan *et al.*, 1995) como que son neuroprotectoras (Giuffrida *et al.*, 2009).

La hipótesis amiloide ha sufrido una desviación hacia la teoría que enfatiza la preponderancia de las formas oligoméricas de  $\beta$ A como las causantes de la enfermedad por sobre las formas insolubles o las monoméricas (Lacor *et al.*, 2004; Shankar *et al.*, 2008; Hayden y Teplow, 2013; Collins-Praino *et al.*, 2014). Algunos estudios han demostrado que los oligómeros de  $\beta$ A<sub>1-42</sub> inducen daño oxidativo y producen hiperfosforilación de la proteína tau, resultando en efectos tóxicos en las sinapsis y las mitocondrias. En ellos, sus agregados se consideran responsables por los daños neuronales y la degeneración vascular en los cerebros de las personas con Alzheimer (Kumar *et al.*, 2015).

Además de los ovillos neurofibrilares de proteína tau y la acumulación de  $\beta$ A, otra característica de la enfermedad de Alzheimer es la disminución de la actividad colinérgica mediada por receptores nicotínicos  $\alpha 7$ . En este sentido, se ha investigado el uso de agonistas parciales y PAMs como terapia. Por ejemplo, el tratamiento con nicotina o con drogas que potencian la función colinérgica central ha mostrado aumentar la atención, el rendimiento en el aprendizaje y la memoria

en pacientes con enfermedad de Alzheimer leve a moderada. Por lo tanto, los nAChRs, tanto en proyecciones de neuronas colinérgicas o dentro de la corteza cumplen un rol en el daño cognitivo en la enfermedad de Alzheimer temprana. (Dineley 2007).

Por otro lado, la rápida desensibilización de  $\alpha 7$  hace que los medicamentos que aumentan los niveles de ACh como así también los agonistas totales o parciales que se unen a los sitios canónicos de unión tengan un efecto limitado. Es por ello que la potenciación de  $\alpha 7$  mediante moduladores alostéricos positivos puede plantearse como una estrategia terapéutica novedosa para mejorar la memoria y la cognición (Chatzidaki y Millar, 2015; Terry *et al.*, 2015; Echeverria *et al.*, 2016; Bouzat *et al.*, 2018).

Existen numerosas evidencias de interacciones funcionales entre el péptido  $\beta A$  y  $\alpha 7$ . Varios estudios han informado que el  $\beta A$  afecta directamente al funcionamiento de  $\alpha 7$  a nivel molecular, presentando efectos tanto de agonista como de antagonista (Pettit *et al.*, 2001; Dineley *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Parri *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2015; Ma y Qian, 2018). Incluso, se plantea que el tipo de efecto podría depender de la concentración de  $\beta A$ , donde en general las bajas concentraciones (del orden picomolar) son agonistas y las altas (nano o micromolares) son inhibitorias (Mura *et al.*, 2012). Estos estudios se han focalizado principalmente en la evaluación de los efectos del  $\beta$ -Amiloide sobre la actividad metabotrópica de  $\alpha 7$ , mientras que los efectos agudos sobre la actividad de canal del receptor han sido explorados solo a nivel de corrientes macroscópicas.

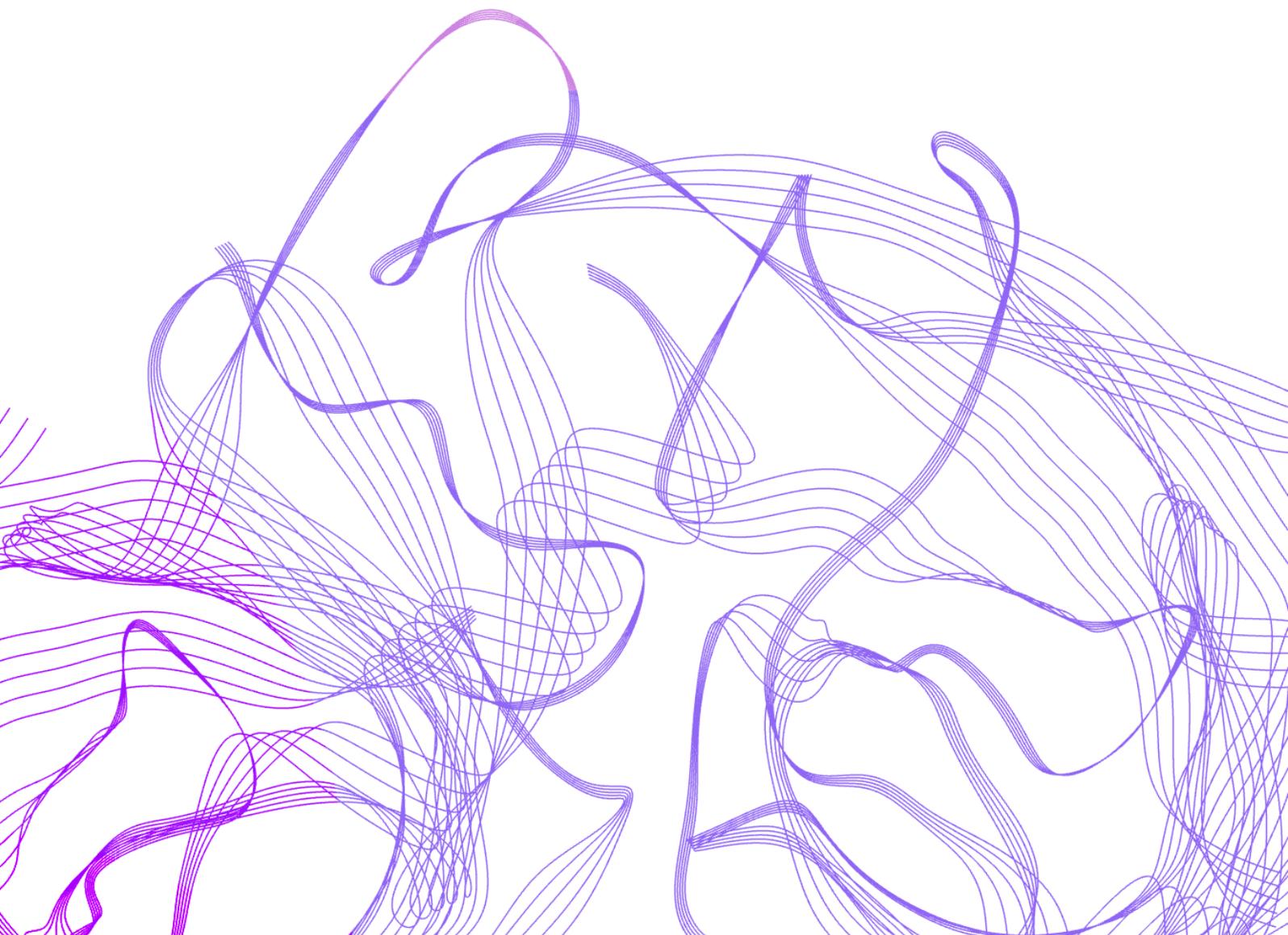
# OBJETIVOS

Existen evidencias que sugieren interacciones funcionales entre el receptor  $\alpha 7$  y los péptidos  $\beta$ -Amiloides, ambos relacionados con la enfermedad de Alzheimer. Además, hay reportes que señalan que las especies oligoméricas del  $\beta$ -Amiloide serían las principales responsables de la neurotoxicidad. En base a estos antecedentes, los objetivos del presente capítulo fueron:

- Establecer las acciones rápidas y directas de oligómeros de  $\beta$ -Amiloide sobre el receptor  $\alpha 7$ .
- Establecer si el  $\beta$ -Amiloide es capaz de inducir cambios conformacionales rápidos en la molécula del receptor  $\alpha 7$ .
- Determinar, mediante registros de canal único, si los oligómeros  $\beta$ -Amiloide son capaces de activar al receptor.
- Definir a nivel de canal único los efectos de los oligómeros  $\beta$ -Amiloide sobre la potenciación del receptor, y si estos efectos dependen del tipo de potenciador empleado.

# RESULTADOS

## CAPÍTULO II



Dado que los oligómeros de  $\beta$ A son actualmente considerados las especies asociadas a los cambios en plasticidad sináptica, la neurodegeneración y la demencia que se dan en la enfermedad de Alzheimer (Lacor *et al.*, 2004; Shankar *et al.*, 2008; Hayden y Teplow, 2013; Collins-Praino *et al.*, 2014; Esparza *et al.*, 2016), se estudiaron sus efectos sobre el receptor  $\alpha$ 7. Con tal fin se generaron los oligómeros mediante técnicas reportadas previamente (Uranga *et al.*, 2010, 2016; Pascual *et al.*, 2017, metodología).

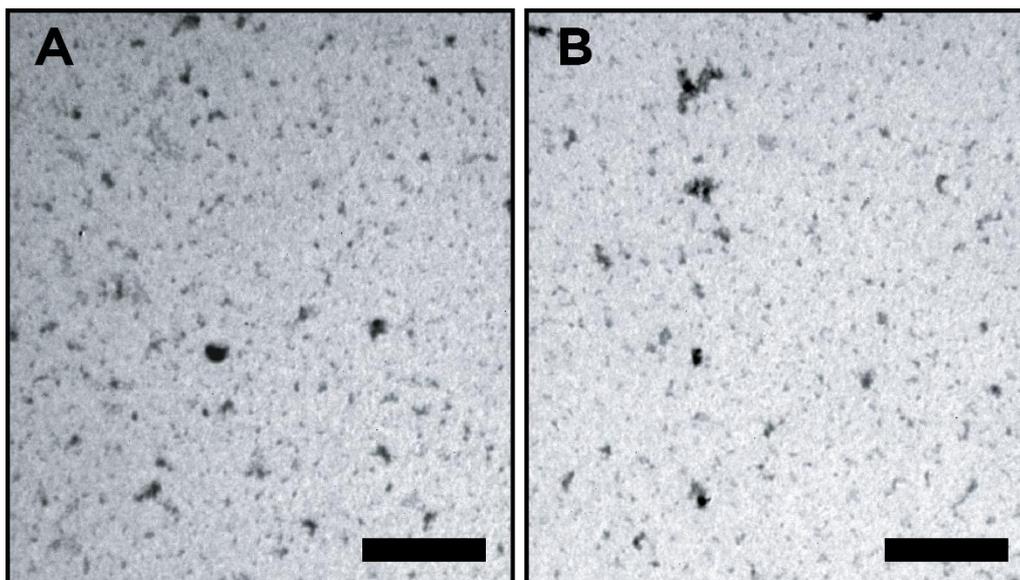
### **ESTADO CONFORMACIONAL DE LOS PÉPTIDOS $\beta$ -AMILOIDE UTILIZADOS**

Con el objetivo de caracterizar el estado de agregación de los péptidos de  $\beta$ A y confirmar la presencia de oligómeros, se realizó microscopía electrónica de transferencia sobre las preparaciones a utilizar en los experimentos.

El análisis de las fotografías de las preparaciones de  $\beta$ A mostró, tanto para el péptido 1-40 como para el 1-42, la presencia de estructuras esféricas individuales o en grupos pequeños, compatibles con un arreglo heterogéneo de oligómeros, lo que permitió descartar la presencia de fibrillas (figura II.1).

### **CAMBIOS CONFORMACIONALES EN $\alpha$ 7 PRODUCIDOS POR $\beta$ -AMILOIDE**

Para examinar la capacidad de los oligómeros de producir cambios conformacionales provocados por  $\beta$ A, se realizaron mediciones de fluorescencia con la sonda sensible a cambios conformacionales cristal violeta (CrV), en colaboración con la Licenciada Camila Fabiani y la Doctora Silvia Antollini del INIBIBB. Este



**Figura II.1** Microscopía electrónica ( $\times 100,000$ ) de las preparaciones de  $\beta A$  que confirma la presencia de estructuras esféricas compatibles con oligómeros. El  $\beta A_{1-40}$  (A) o  $\beta A_{1-40}$  (B) fueron preparados de acuerdo a lo descrito en metodología. Las barras de escala corresponden a  $0,2 \mu m$ .

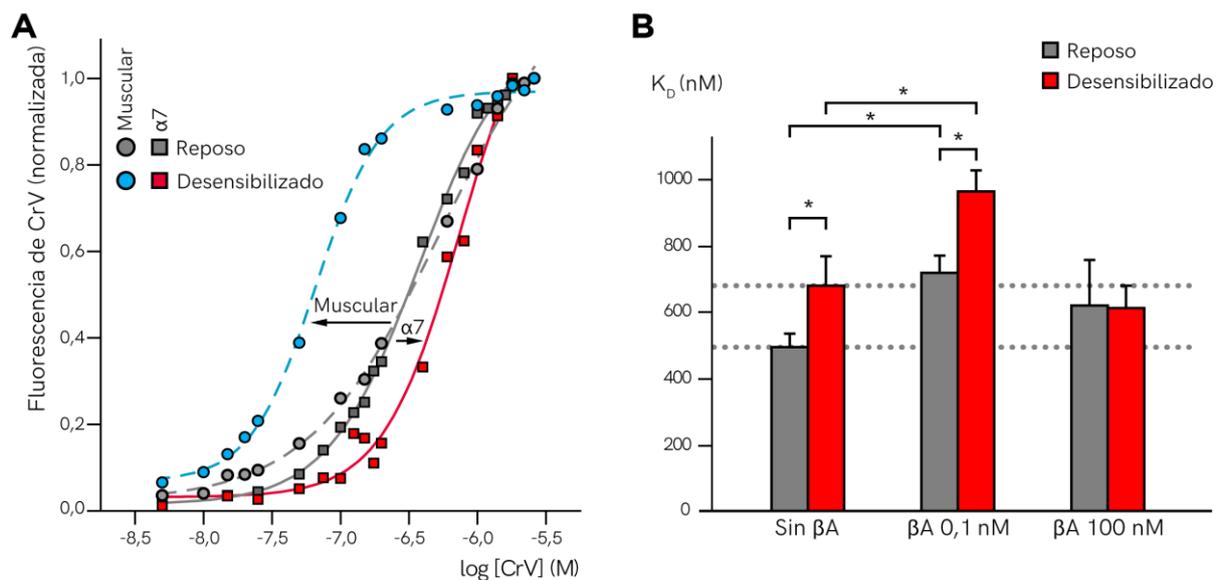
compuesto ha sido utilizado para estudios en el nAChR de tipo muscular de *Torpedo californica*, donde se ha observado que cambia su afinidad por el receptor dependiendo de si este último se encuentra en estado de reposo o desensibilizado, variando la constante de disociación ( $K_D$ ) de  $\sim 400 \text{ nM}$  a  $\sim 60 \text{ nM}$  respectivamente (Fabiani et al., 2018; Fernandez Nievas et al., 2008; Perillo et al., 2012, figura II.2A). Es decir, el receptor aumenta su afinidad por el CrV al pasar del estado de reposo al desensibilizado.

Dado que hasta el inicio de este trabajo de tesis la sonda CrV solo se había empleado en estudios con el nAChR muscular pero no en el receptor  $\alpha 7$  humano, en primer lugar, se determinó si la sonda era capaz de sensar cambios conformacionales también en este último receptor. Para ello se transfectaron células BOSC 23 con el ADNc de la subunidad  $\alpha 7$ , se resuspendieron en PBS y se realizaron titulaciones con concentraciones crecientes de CrV sobre esta suspensión, en estado de reposo y desensibilizado del canal, el cual fue inducido

realizando una preincubación de 20 minutos con carbamilcolina (Carb).

La unión a saturación de CrV alcanzó un valor de  $K_D$  de  $492 \pm 41$  nM para  $\alpha 7$  en el estado de reposo, lo que indica una afinidad similar a la del receptor muscular. Las mediciones en el estado desensibilizado arrojaron un valor de  $680 \pm 89$  nM para la unión de CrV. Estos resultados indican que CrV satura sus sitios de unión al receptor en ambas condiciones, con diferentes afinidades y de manera inversa al perfil de unión para el receptor muscular, ya que CrV muestra sobre el receptor  $\alpha 7$  mayor afinidad por el estado de reposo que por el desensibilizado. Las intensidades máximas de fluorescencia de las muestras fueron similares en condiciones de reposo y desensibilización, descartando entonces que la menor afinidad por los receptores desensibilizados corresponda a una reducción de unión de la sonda en el último estado. Estos experimentos demostraron que la sonda CrV puede ser utilizada para sensar cambios conformacionales en el receptor  $\alpha 7$  (figura II.2A).

A continuación, se determinaron los efectos de concentraciones bajas (100 pM) y altas (100 nM) de  $\beta A_{1-40}$  sobre la conformación de  $\alpha 7$  midiendo los valores de  $K_D$  de CrV en los estados de reposo y desensibilizado. La exposición de  $\alpha 7$  en el estado de reposo (en ausencia de Carb) a oligómeros de  $\beta A_{1-40}$  incrementó los valores de  $K_D$  para CrV hacia aquellos correspondientes al estado desensibilizado, indicando que los péptidos amiloides inducen cambios conformacionales en  $\alpha 7$ . La adición de Carb indujo un mayor desplazamiento hacia valores más altos de  $K_D$ , sugiriendo que el agonista puede, junto con el  $\beta$ -Amiloide, inducir un nuevo estado conformacional. Los valores de  $K_D$  para las condiciones desensibilizadas fueron diferentes en la ausencia y presencia de  $\beta A$ . Se obtuvieron resultados similares con



**Figura II.2** A. Curvas de titulación con CrV obtenidas con membranas ricas en el nAChR muscular de *T. californica* (círculos) y con células que expresan el receptor  $\alpha 7$  humano (cuadrados) en ausencia (gris) y presencia (celeste, rojo) de Carb. Las flechas indican los cambios desde el estado de reposo al desensibilizado para cada tipo de nAChR. B. Cambios en los valores de  $K_D$  por la exposición a bajas (0,1 nM) y altas (100 nM) concentraciones de  $\beta A_{1-40}$ . Cada columna representa la media  $\pm$  desvío estándar de cuatro o más experimentos individuales. (\*)  $p < 0,05$ .

oligómeros de  $\beta A_{1-42}$  100 nM.

Por otra parte, la incubación de receptores en reposo con concentraciones 1000 veces mayores (100 nM) de  $\beta A_{1-40}$  no produjo cambios estadísticamente significativos en los valores de  $K_D$  del CrV. Además, los valores de  $K_D$  permanecieron constantes incluso ante la adición de Carb 20 mM, indicando que  $\alpha 7$  no fue reactivo a la adición de agonista. Resultados similares se obtuvieron con  $\beta A_{1-42}$  100 nM (figura II.2 B).

## ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR $\alpha 7$ POR BAJAS CONCENTRACIONES DE $\beta$ -AMILOIDE OLIGOMÉRICO

Luego de establecer que el  $\beta A$  oligomérico provoca cambios conformacionales en el receptor  $\alpha 7$ , aprovechamos la potencia de los registros de *patch clamp* a nivel de

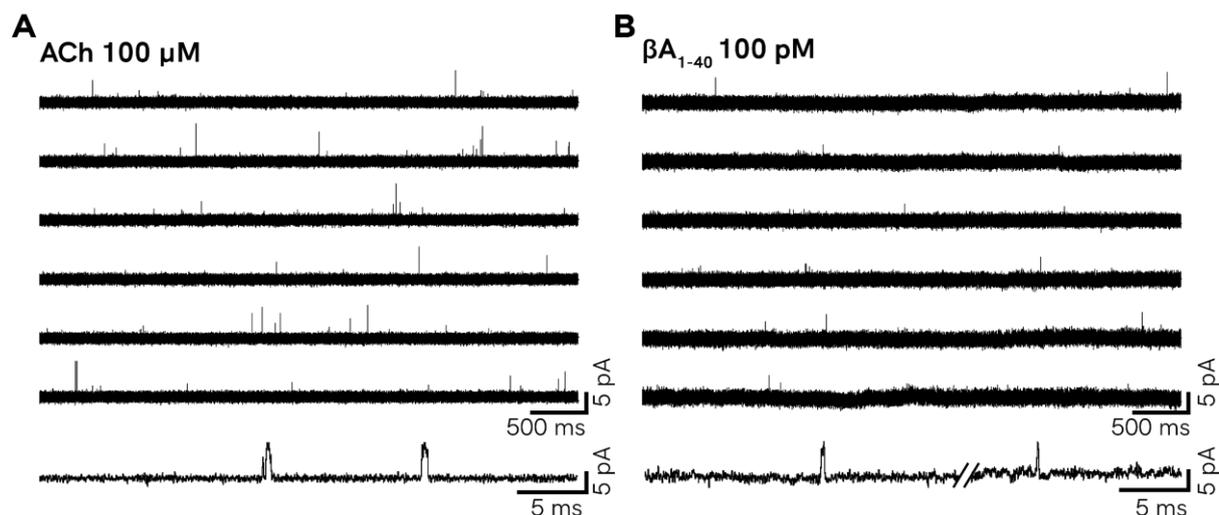
canal único para explicar el mecanismo de dicho efecto.

En primer lugar, para determinar si los oligómeros de  $\beta A$  tienen la capacidad de producir la activación del receptor  $\alpha 7$ , se realizaron registros de canal único en presencia de  $\beta A$  en la solución de pipeta y en ausencia de ACh.

Como se describió en el capítulo anterior de esta tesis, en la presencia de ACh 100  $\mu M$ ,  $\alpha 7$  exhibe aperturas individuales muy breves separadas por cierres largos; o, menos frecuentemente, unas pocas aperturas en rápida sucesión separadas por cierres breves, *bursts*. La media de la duración de los eventos de apertura fue de  $0,36 \pm 0,07$  ms y la duración media de los *bursts* fue de  $0,77 \pm 0,21$  ms. No se observó actividad de  $\alpha 7$  en ausencia de agonista.

En ausencia de ACh, al incluir oligómeros de  $\beta A_{1-40}$  a una concentración 100 pM en la solución de pipeta, se detectaron eventos de apertura breves típicos similares a los detectados en presencia de agonista (figura II.3). El número de parches con actividad fue muy bajo en esta condición (2 de 8 parches de diferentes células), y, a su vez, la frecuencia de aperturas fue mínima. No se detectó actividad al incrementar la concentración de  $\beta A$  a 10 nM o 100 nM, lo que indica que la activación se favorece a bajas concentraciones del péptido. Estos experimentos se realizaron en paralelo con registros con ACh como agonista, para descartar que la falta de eventos de apertura fuera debida a una baja expresión del receptor en nuestro sistema heterólogo.

Dado el bajo porcentaje de parches con actividad y a la baja frecuencia de eventos detectados, se utilizó al PAM de tipo II PNU-120596 en los siguientes experimentos. Como este PAM aumenta la probabilidad de apertura del canal

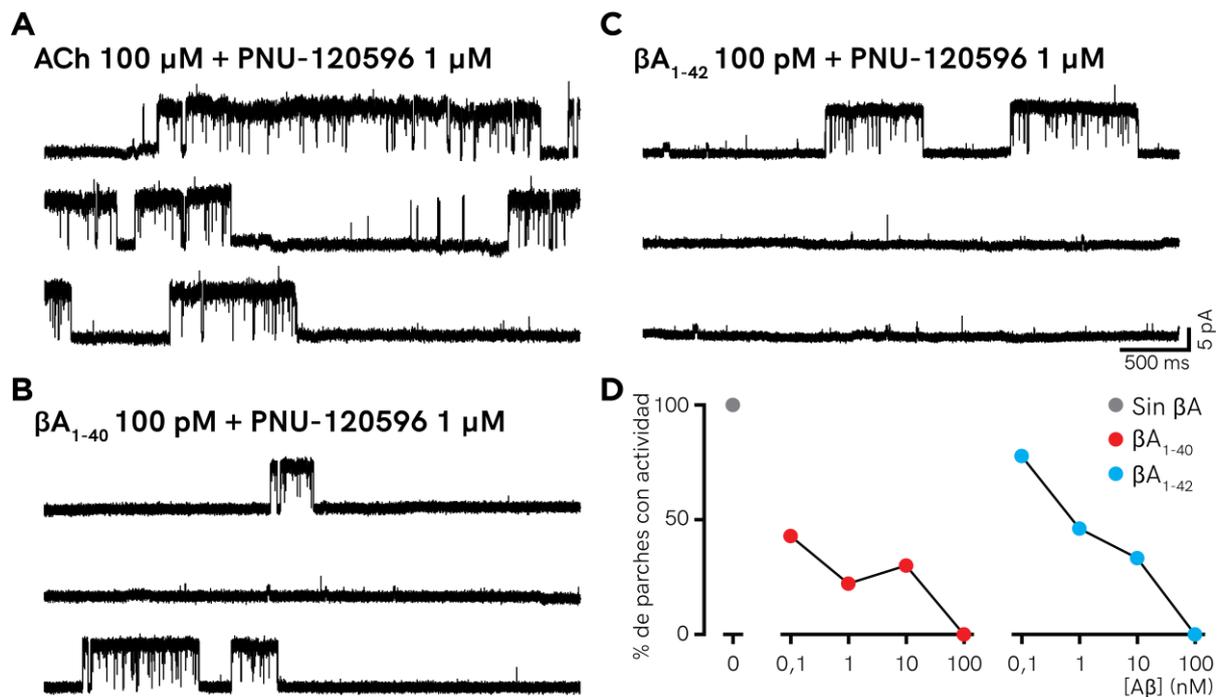


**Figura II.3** Actividad de canal único de  $\alpha 7$  generada por ACh 100  $\mu\text{M}$  (A) y  $\beta\text{A}_{1-40}$  100 pM (B). Para cada condición se muestra un trazo a mayor resolución temporal (abajo). Potencial de membrana: -70 mV.

mediada por agonista, en consecuencia, favorece la detección de eventos de apertura poco frecuentes. Como se mencionó anteriormente, PNU-120596 no puede por sí solo activar a  $\alpha 7$  (figura II.4A).

Se realizaron, entonces, registros a nivel de canal único incluyendo en la solución de pipeta PNU-120596 1  $\mu\text{M}$  en conjunto con oligómeros de  $\beta\text{A}_{1-40}$  o  $\beta\text{A}_{1-42}$ , sin incluir ACh. En estas condiciones,  $\beta\text{A}_{1-40}$  y  $\beta\text{A}_{1-42}$  a baja concentración (100 pM) provocaron la activación del receptor  $\alpha 7$ , detectándose en los registros de canal único los *clusters* típicos que aparecen cuando se emplea ACh y PNU-120596 (figura II.4B y C). Nuevamente, la proporción de parches con actividad fue menor que la que se observó en presencia de ACh: mientras que más del 95% de los parches mostraron actividad de canal al emplear ACh como agonista, el porcentaje de los parches activos se redujo a 42% o 77% en presencia de  $\beta\text{A}_{1-40}$  y  $\beta\text{A}_{1-42}$  100 pM, respectivamente.

Para probar el efecto de la concentración de  $\beta\text{A}$  sobre la activación del receptor en presencia del potenciador, se realizaron luego registros incrementando



**Figura II.4** Actividad de canal único de  $\alpha$ 7 generada por ACh 100  $\mu$ M (A),  $\beta$ A<sub>1-40</sub> 100 pM (B) y  $\beta$ A<sub>1-42</sub> 100 pM (C), en la presencia del PAM PNU-120596. Potencial de membrana: -70 mV. D. Al aumentar la concentración de  $\beta$ A, el número de parches con actividad decrece hasta ser nulo a 100 nM.

la concentración de  $\beta$ A en la solución de pipeta. A medida que la concentración de  $\beta$ A se incrementó, el número de parches mostrando actividad de  $\alpha$ 7 disminuyó. Por ejemplo, a una concentración de  $\beta$ A 1 nM, la cantidad de parches con actividad fue del 22% y del 46% para  $\beta$ A<sub>1-40</sub> y  $\beta$ A<sub>1-42</sub> respectivamente. A 100 nM, no se detectó actividad  $\alpha$ 7 producida por  $\beta$ A, tanto para  $\beta$ A<sub>1-40</sub> como para  $\beta$ A<sub>1-42</sub>.

La frecuencia de los *clusters* detectados en registros realizados en presencia de ACh y PNU-120596 es usualmente muy variable entre parches de diferentes transfecciones celulares. De todos modos, dicha frecuencia fue sistemáticamente significativamente menor en la presencia de  $\beta$ A con respecto a ACh. Para estos experimentos, se realizaron registros control con ACh y PNU-120596 con el mismo lote de células transfectadas para evitar sesgos relacionados con variaciones en el nivel de expresión de  $\alpha$ 7 entre diferentes lotes de células.

Estos resultados muestran que, incluso en la presencia de un PAM, la activación del receptor  $\alpha 7$  por  $\beta A$  se ve favorecida a concentraciones picomolares o nanomolares bajas.

En la presencia de ACh y PNU-120596, cada *cluster* está compuesto de dos o tres *bursts* que contienen aperturas de larga duración separadas por cierres breves. Bajo las condiciones presentes, la media de duración del *cluster* en la presencia de ACh 100  $\mu M$  y PNU-120596 1  $\mu M$  fue  $2263 \pm 990$  ms (tabla II.1). Los *clusters* provocados por  $\beta A$  en la presencia de PNU-120596 mostraron la arquitectura típica observada cuando ACh es el agonista. El análisis no mostró diferencias estadísticamente significativas en la duración media del *cluster* en las concentraciones testeadas, salvo para el caso de  $\beta A_{1-40}$  10 nM, en donde la duración

[ACh] ( $\mu M$ )	$\beta A$	[ $\beta A$ ] (nM)	% de parches con actividad (n)	Duración media del <i>cluster</i> (ms)
100	No	0	100 (6)	$2263 \pm 990$
0	$\beta A_{1-40}$	0,1	42,9 (7)	$762 \pm 316$
0		1	22,2 (18)	$2016 \pm 1364$
0		10	30,0 (10)	<b><math>5229 \pm 1392^*</math></b>
0		100	0 (9)	-
0	$\beta A_{1-42}$	0,1	77,8 (9)	$1401 \pm 805$
0		1	46,2 (13)	$1208 \pm 946$
0		10	33,3 (9)	$1751 \pm 766$
0		100	0 (6)	-

**Tabla II.1** Duración media de los *clusters* de  $\alpha 7$  activado por ACh o  $\beta A$ , en presencia de PNU-120596 1  $\mu M$ . Los datos se presentan como media  $\pm$  desvío estándar. Las comparaciones se realizaron mediante el análisis de varianza empleando el test de múltiples comparaciones de Dunett. (\*)  $p < 0,05$ .

resultó ser más larga (tabla II.1). Es necesario destacar que debido a que la frecuencia de *clusters* en cada parche fue menor que la observada en la presencia de ACh, existieron grandes variaciones en la duración media de *clusters* entre parches de la misma condición.

### **DISMINUCIÓN POR $\beta$ -AMILOIDE DE LA DURACIÓN DE LOS EPISODIOS DE ACTIVACIÓN DE $\alpha 7$ MEDIADOS POR ACh**

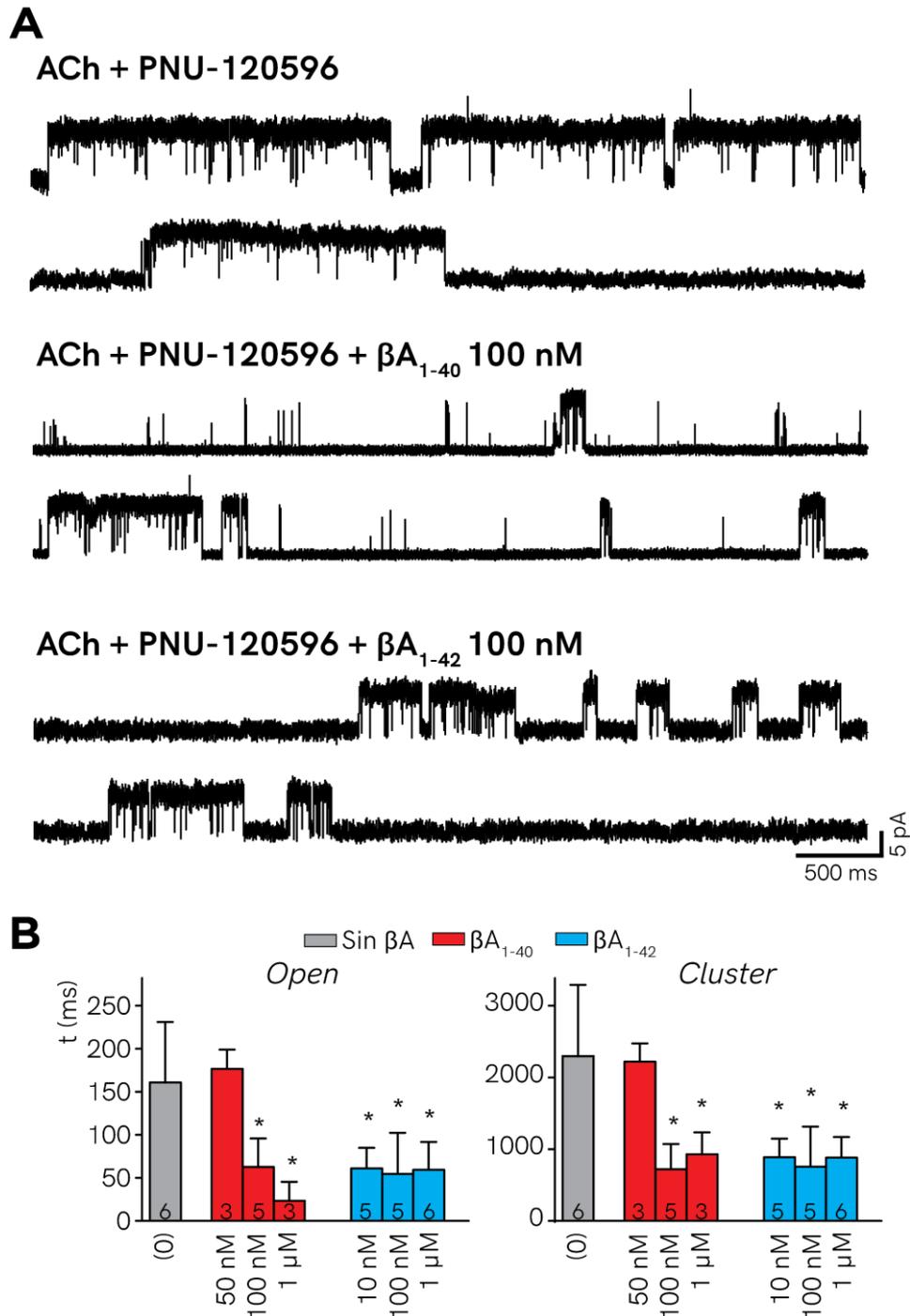
Para evaluar el efecto del  $\beta$ A sobre la duración de los episodios de apertura provocados por el agonista fisiológico de  $\alpha 7$ , se probó la acción combinada del  $\beta$ A con ACh sobre el receptor.

En primer lugar, se realizaron registros de canal único activados por ACh 100  $\mu$ M en la en la presencia de  $\beta A_{1-40}$  (10 y 100 nM). La duración media de las aperturas y los *bursts* a ambas concentraciones fue ligeramente menor que la del control, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas (tabla II.2).

Debido a que las duraciones de los eventos de apertura son muy breves, las diferencias en estos valores pueden no ser muy precisas dado que se acercan al límite de resolución de nuestro sistema. Para superar este inconveniente, se ensayó el efecto del  $\beta$ A (10 nM – 1  $\mu$ M) en canales activados por ACh en la presencia de PNU-120596 1  $\mu$ M. Este PAM, al aumentar la duración de los episodios de activación, permite una mejor descripción de los efectos moleculares (figura II.5A).

En estas condiciones, se encontró que tanto el  $\beta A_{1-40}$  como el  $\beta A_{1-42}$

produjeron una reducción estadísticamente significativa de la media de duración del componente más lento de aperturas individuales y de los *clusters* detectados en presencia de ACh y PNU-120596 a aproximadamente un tercio del valor control



**Figura II.5**  $\beta A$  disminuye la duración de los episodios de activación provocados por ACh 100  $\mu$ M y potenciados por PNU-120596 1  $\mu$ M. A. Se muestran trazos representativos para cada condición. Potencial de membrana: -70 mV. B. Disminución de la media de las duraciones de *open* y *cluster* por la presencia de  $\beta A$ . Los valores se presentan como la media  $\pm$  desvío estándar. El número de registros para cada condición se muestra en las barras. Las comparaciones se realizaron mediante el análisis de varianza empleando el test de múltiples comparaciones de Dunnett. (\*)  $p < 0,05$ .

en cada caso. Para el caso del  $\beta A_{1-42}$  esta reducción se produce a partir de 10 nM; en el caso del  $\beta A_{1-40}$ , a partir de 100 nM (figura II.5, tabla II.2).

PAM	$\beta A$	$\beta A$ (nM)	n	Duración media <i>open</i> (ms)	Duración media <i>burst/cluster</i> (ms)
No	No	0	3	0,36 ± 0,07	0,77 ± 0,21
	$\beta A_{1-42}$	10	3	0,26 ± 0,02	0,48 ± 0,06
		100	3	0,27 ± 0,04	0,49 ± 0,11
PNU-120596 1 $\mu M$	No	0	6	159,6 ± 69,6	2263 ± 990
	$\beta A_{1-40}$	50	3	176,7 ± 22,5	2220 ± 256
		100	5	<b>61,6 ± 33,1*</b>	<b>698 ± 409*</b>
		1000	3	<b>23,4 ± 22,0*</b>	<b>931 ± 303*</b>
	$\beta A_{1-42}$	10	5	<b>61,1 ± 23,8*</b>	<b>888 ± 261*</b>
		100	5	<b>54,7 ± 47,8*</b>	<b>755 ± 560*</b>
		1000	6	<b>59,6 ± 32,2*</b>	<b>883 ± 289*</b>

**Tabla II.2** Disminución de la duración de los episodios de activación potenciados por PNU-120596 por la presencia de  $\beta A$ . En todos los casos la activación del receptor se realizó con ACh 100  $\mu M$ . Los datos se presentan como media  $\pm$  desvío estándar. Las comparaciones se realizaron mediante el análisis de varianza empleando el test de múltiples comparaciones de Dunnett. (\*)  $p < 0,05$ .

## EFFECTOS DEL $\beta$ -AMILOIDE SOBRE LA POTENCIACIÓN DE $\alpha 7$ CON PAMs DE DISTINTOS TIPOS

Para determinar si el efecto sobre la potenciación del receptor  $\alpha 7$  causado por el  $\beta A$  es específico sobre los PAMs de tipo II, se evaluó la acción de los péptidos en canales activados por ACh y potenciados por NS-1738, que es un PAM de tipo I. La potenciación por este compuesto es notablemente menor que la que produce

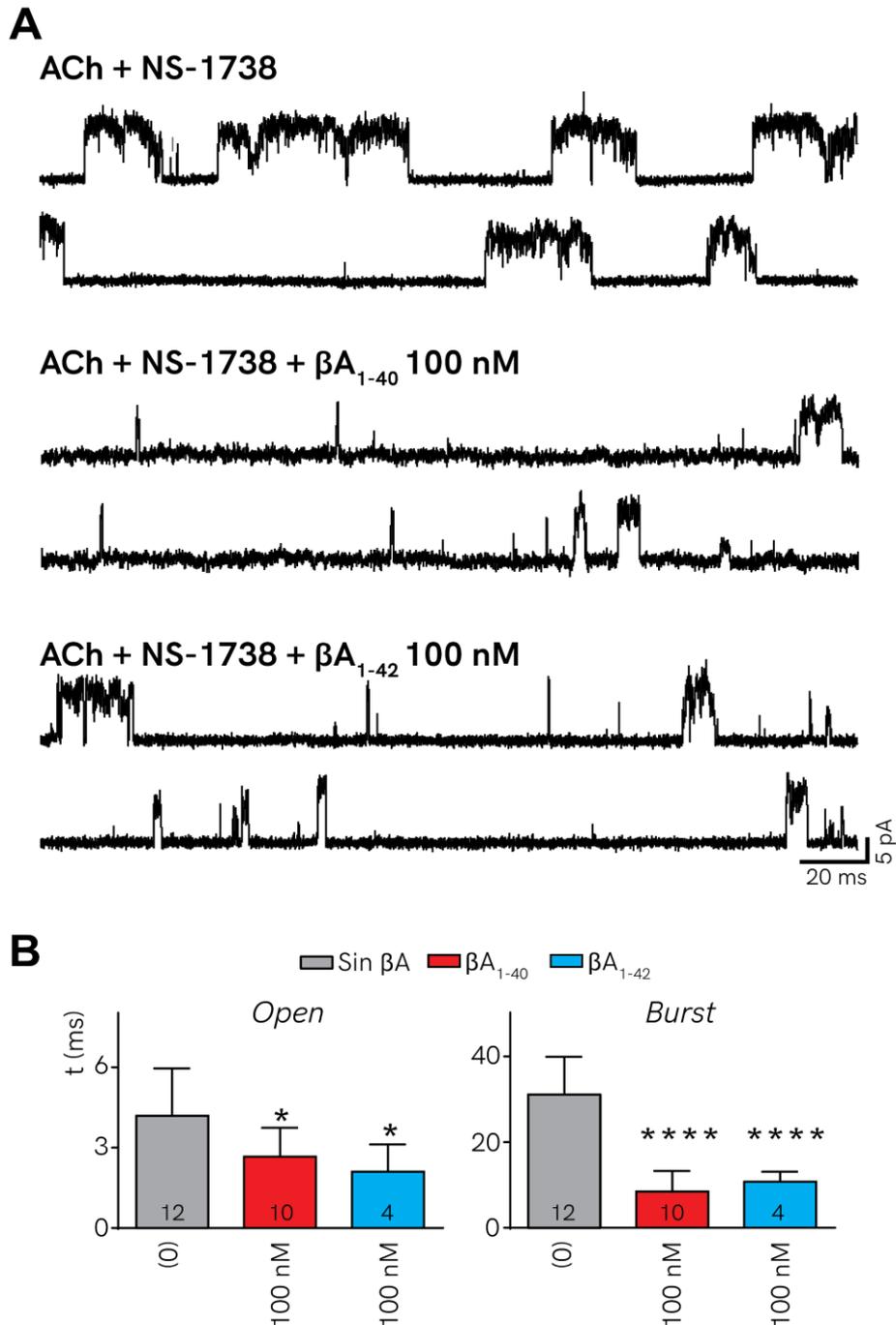
PNU-120596. Una concentración 10  $\mu\text{M}$  de NS-1738 incrementa la duración de los eventos producidos por ACh de 0,36 ms a aproximadamente 4 ms (tabla II.3), contra los 160 ms de duración en el caso de la potenciación por PNU-120596. Los eventos de apertura aparecen agrupados en *bursts* de aperturas separadas por cierres breves, con una media de duración de 31 ms (figura II.6A, tabla II.3).

En presencia de ACh 100  $\mu\text{M}$  y NS-1738 10  $\mu\text{M}$ , oligómeros de  $\beta\text{A}_{1-40}$  o  $\beta\text{A}_{1-42}$  en concentración 100 nM produjeron la reducción tanto de las aperturas individuales como de los *bursts* a aproximadamente la mitad y un tercio de la duración en su ausencia, respectivamente (figura II.6, tabla II.3).

Por lo tanto, se concluye que la duración de los episodios provocados por ACh y potenciados por ambos tipos de potenciadores es reducida por el  $\beta\text{A}$  a concentraciones nanomolares.

PAM	$\beta\text{A}$	$\beta\text{A}$ (nM)	n	Duración media <i>open</i> (ms)	Duración media <i>burst</i> (ms)
NS-1738 10 $\mu\text{M}$	No	0	12	4,2 $\pm$ 1,8	31,1 $\pm$ 8,8
	$\beta\text{A}_{1-40}$	100	10	<b>2,7 <math>\pm</math> 1,1*</b>	<b>8,4 <math>\pm</math> 4,8****</b>
	$\beta\text{A}_{1-42}$	100	4	<b>2,1 <math>\pm</math> 1,0*</b>	<b>10,7 <math>\pm</math> 2,4****</b>

**Tabla II.3** Disminución de la duración de los episodios de activación potenciados por NS-1738 por la presencia de  $\beta\text{A}$ . En todos los casos la activación del receptor se realizó con ACh 100  $\mu\text{M}$ . Los datos se presentan como media  $\pm$  desvío estándar. Las comparaciones se realizaron mediante el análisis de varianza empleando el test de múltiples comparaciones de Dunnett. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .



**Figura II.6**  $\beta A$  disminuye la duración de los episodios de activación provocados por ACh 100  $\mu M$  y potenciados por NS-1738 10  $\mu M$ . A. Se muestran trazos representativos para cada condición. Potencial de membrana: -70 mV. B. Disminución de la media de las duraciones de *open* y *burst* por la presencia de  $\beta A$ . Los valores se presentan como la media  $\pm$  desvío estándar. El número de registros para cada condición se muestra en las barras. Las comparaciones se realizaron mediante el análisis de varianza empleando el test de múltiples comparaciones de Dunnett. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

# DISCUSIÓN

## CAPÍTULO II



Se ha reportado que los péptidos de  $\beta$ -Amiloide en el cerebro de las personas sanas, que pueden alcanzar concentraciones del orden picomolar, poseen roles fisiológicos, mientras que en la enfermedad de Alzheimer alcanzan concentraciones nanomolares, desatando la formación de placas insolubles, una de las principales cualidades de esta patología (Dineley, 2007; Parihar y Brewer, 2011; Puzzo *et al.*, 2015). Otra de las características de esta enfermedad es el déficit colinérgico severo, que involucra principalmente a los nAChRs  $\alpha 4\beta 2$  y  $\alpha 7$ .

Se ha establecido que  $\alpha 7$  exhibe una afinidad por el  $\beta A$  excepcionalmente alta, una interacción que podría influenciar la transmisión sináptica y la plasticidad neuronal, e incluso contribuir a la disfunción de las redes neuronales y al mencionado déficit colinérgico (Wang, 2000; Buckingham *et al.*, 2009; Dineley *et al.*, 2015; Hascup y Hascup, 2016).

Varios reportes han descrito las vías intracelulares involucradas en la toxicidad por  $\beta A$  como también una asociación entre  $\beta A$  y vías de señalización activadas por el receptor  $\alpha 7$  (Buckingham *et al.*, 2009; Parri *et al.*, 2011). De todos modos, el mecanismo molecular por el cual el  $\beta A$  afecta la actividad ionotrópica del receptor no está bien entendido y ha sido explorado principalmente a nivel de corrientes macroscópicas. Por lo tanto, utilizamos las ventajas de dos diferentes abordajes para descifrar las bases moleculares de las acciones directas del  $\beta A$  sobre  $\alpha 7$ .

Nuestros resultados espectroscópicos revelaron que **el receptor  $\alpha 7$  adopta distintas conformaciones estables dependiendo del rango de concentraciones de  $\beta A$** , y nuestros registros de canal único revelaron que **el  $\beta A$**

**provoca aperturas del receptor a bajas concentraciones (en el rango picomolar a nanomolar bajo), mientras que a altas concentraciones (en el rango nanomolar a micromolar bajo) disminuye la duración de los episodios de activación provocados por ACh.** Ambos resultados apoyan la idea de que el  $\beta$ A puede ser agonista y también un modulador negativo de  $\alpha 7$  a diferentes rangos de concentración.

Uno de los principales problemas de trabajar con  $\beta$ A se relaciona con la estandarización de las preparaciones, dado que la agregación del péptido es un proceso dinámico y complejo, altamente sensible a la preparación y a las condiciones experimentales (Bitan *et al.*, 2005; Buckingham *et al.*, 2009; Hayden y Teplov, 2013; Watt *et al.*, 2013). Por ello las preparaciones son usualmente heterogéneas, dado que muchos tipos de especies solubles coexisten. Este escenario, de todos modos, imita las situaciones fisiológicas y patológicas en las que diferentes especies oligoméricas y fibrilares coexisten en un equilibrio dinámico (Walsh *et al.*, 2000; Shankar *et al.*, 2008; Noguchi *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2012; Esparza *et al.*, 2016). En particular, nuestros resultados, obtenidos utilizando muestras heterogéneas de oligómeros carentes de fibrillas, son consistentes con reportes anteriores que utilizan preparaciones similares (Liu *et al.*, 2001; Dineley *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2010; Palop y Mucke, 2010; Tong *et al.*, 2011).

La actividad ionotrópica del receptor  $\alpha 7$  está caracterizada por eventos de apertura muy breves, en la escala de los microsegundos, y por una rápida desensibilización (Bouzat *et al.*, 2008; Corradi y Bouzat, 2016). Encontramos que el  $\beta$ A es capaz de provocar su activación tanto en la ausencia como en la presencia

del PAM de tipo II PNU-120596. En ambas condiciones, la activación por  $\beta$ A fue favorecida a 100 pM o a concentraciones nanomolares bajas, y no se detectó a concentraciones micromolares, en concordancia con los resultados de corrientes macroscópicas ya reportados en ovocitos para  $\alpha$ 7 (Dineley *et al.*, 2002, 2015).

La actividad de canal provocada por  $\beta$ A fue significativamente menor con respecto a la provocada por ACh en términos del número de parches que mostraron actividad como también de la frecuencia de aperturas dentro de los registros. De todos modos, una vez que el canal se abre, la duración media de las aperturas y la arquitectura y duración media de los *clusters* fueron similares a aquellas provocadas por ACh en presencia del PAM.

Los cambios conformacionales del receptor  $\alpha$ 7 provocados por la presencia de  $\beta$ A a baja concentración fueron sentidos mediante el uso de la sonda cristal violeta (CrV). A una concentración de 100 pM, el  $\beta$ A oligomérico indujo la conformación del receptor hacia la del estado desensibilizado según la afinidad por el CrV, pero la subsecuente adición de carbamilcolina (Carb) permitió otros cambios conformacionales. A pesar de que este método mide conformaciones en equilibrio y no puede proveer información sobre las constantes de disociación para los canales en el estado abierto, el hecho de que en la presencia de  $\beta$ A  $\alpha$ 7 siga respondiendo a Carb es compatible con la inducción tanto de estados de apertura como de desensibilización. De todos modos, la conformación de  $\alpha$ 7 en la presencia de concentraciones bajas y altas de Carb es diferente a la del estado desensibilizado (con concentraciones de Carb altas en ausencia de  $\beta$ A), indicando así la inducción de un nuevo estado conformacional.

El rol protector de la estimulación de la actividad del receptor  $\alpha 7$  en la enfermedad de Alzheimer y para el tratamiento del daño cognitivo y de la memoria asociados a enfermedades neurológicas está bien establecido (Inestrosa *et al.*, 2013; Lendvai *et al.*, 2013; Wallace y Bertrand, 2013; Uteshev, 2014; Dineley *et al.*, 2015; Corradi y Bouzat, 2016; Yang *et al.*, 2017). Además, un rol protector fisiológico ha sido propuesto para el  $\beta A$  soluble a bajas concentraciones en individuos sanos (Puzzo *et al.*, 2015). Por lo tanto, la capacidad de bajas concentraciones de  $\beta A$  para activar  $\alpha 7$  podría estar involucrada en estos efectos fisiológicos beneficiosos.

Varios reportes han mostrado que altas concentraciones de  $\beta A$  poseen un efecto inhibitorio en la amplitud de las corrientes macroscópicas generadas por el receptor  $\alpha 7$  como también en las vías de señalización (Dineley *et al.*, 2002; Parri *et al.*, 2011). De acuerdo con estos resultados, encontramos que, en la presencia de PAMs, la duración media de los episodios de activación (*bursts* o *clusters*), que se originan de una única molécula de receptor, como también la duración de las aperturas individuales del canal son reducidas significativamente por concentraciones altas de  $\beta A$  oligomérico. Incluso hallamos una tendencia a la reducción en ausencia de PAMs, pero los resultados no fueron estadísticamente significativos con respecto a la condición control. Dadas las duraciones tan breves de los eventos de apertura en este caso, que se encuentran muy cercanos a la resolución temporal de nuestro sistema, esta reducción podría estar siendo subestimada. Desde un punto de vista mecanístico, la duración disminuida de los episodios de activación y aperturas podría ser compatible con un aumento en la desensibilización y/o un bloqueo del canal. Podemos descartar un bloqueo rápido

del canal abierto, dado que los cierres breves correspondientes a aperturas bloqueadas (*flickering*) no fueron detectados.

El aumento en la desensibilización y bloqueo lento del canal son procesos difíciles de distinguir mediante técnicas de electrofisiología (Arias *et al.*, 2009; Bouzat y Sine, 2018). Los experimentos con CrV mostraron que a altas concentraciones de  $\beta A$ ,  $\alpha 7$  adopta un estado conformacional que no es diferente al estado de reposo en términos de los valores de  $K_D$  para CrV y desde este estado el receptor no es reactivo a la adición de Carb. En concordancia con estas observaciones, se mostró para el nAChR muscular que el bloqueador de canal QX-314 no cambia la  $K_D$  de CrV para el estado de reposo y que este valor permanece constante incluso en la presencia de Carb (Fabiani *et al.*, 2018). Por lo tanto, podemos inferir que el  $\beta A$  oligomérico a altas concentraciones se comporta como un bloqueador lento de canal de  $\alpha 7$ . La actividad reducida de  $\alpha 7$  en la presencia de  $\beta A$  podría contribuir al déficit de señalización colinérgica y por lo tanto estar involucrado en el inicio y desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

La acción combinada de PAMs y  $\beta A$  sugiere que la potenciación de  $\alpha 7$  por PAMs podría probablemente ser menor de la esperada en pacientes con enfermedad de Alzheimer. Mediante registros de corrientes macroscópicas se ha demostrado que el  $\beta A_{1-42}$  inhibe receptores  $\alpha 4\beta 2$  y  $\alpha 2\beta 2$  y esta inhibición no ocurre en la presencia de un PAM (Pandya y Yakel, 2011). Estos resultados no están en completo desacuerdo con los nuestros dado que, a pesar de reducida, todavía detectamos potenciación. La caracterización de la influencia del  $\beta A$  en la potenciación del receptor  $\alpha 7$  contribuye a una mejor extrapolación de los efectos moleculares de los PAMs a su potencial efecto terapéutico.

El sitio de unión de  $\beta$ A al receptor  $\alpha 7$  sigue sin ser conocido. Estudios computacionales de *docking* han sugerido que el  $\beta$ A podría interactuar con el sitio de unión al agonista en las interfases entre subunidades. (Espinoza-Fonseca, 2004) y la tirosina 188 en el *loop C* de este sitio fue propuesta como involucrada en la activación de  $\alpha 7$  por  $\beta$ A (Tong *et al.*, 2011). Por otra parte, la cavidad transmembrana, un sitio de unión para diferentes ligandos alostéricos en la familia de receptores *cys-loop* (Young *et al.*, 2008; Sauguet *et al.*, 2015; Corradi y Bouzat, 2016) fue propuesta como involucrada en el bloqueo no competitivo por  $\beta$ A en receptores  $\alpha 4\beta 2$  (Pandya y Yakel, 2011). Nuestros resultados espectroscópicos demuestran que en la presencia de bajas concentraciones de  $\beta$ A  $\alpha 7$  sigue siendo reactivo a Carb, sugiriendo que el  $\beta$ A no ocupa el sitio ortostérico de unión al agonista y, en consecuencia, la activación puede ocurrir a través de sitios alostéricos. La activación alostérica de  $\alpha 7$  a través de un sitio transmembrana se ha demostrado para 4BP-TQS. De todos modos, el perfil de actividad es muy diferente al de ACh, que no es el caso de  $\beta$ A (Gill *et al.*, 2011; Lasala *et al.*, 2018). Alternativamente, el  $\beta$ A podría no ocupar los cinco sitios ortostéricos de agonista y seguir siendo capaz de inducir activación; los sitios restantes, subsecuentemente ocupados por Carb, podrían favorecer la activación y desensibilización. Esta posibilidad se encuentra en acuerdo con reportes previos de nuestro laboratorio, en los que se demostró que la ocupación de solo uno de los sitios de activación del agonista es suficiente para la activación de  $\alpha 7$  (Andersen *et al.*, 2013). A altas concentraciones,  $\beta$ A podría inhibir a  $\alpha 7$  actuando a través de un sitio alostérico, diferente del de CrV, dado que no interfiere con su unión. Las acciones duales como agonistas de baja eficacia y bloqueadores de canales se han descrito para varios

compuestos, actuando en diferentes sitios de los nAChRs (Bouzat y Mukhtasimova, 2018; Bouzat y Sine, 2018).

En conclusión, nuestros resultados proveen información desde una perspectiva molecular para comprender las acciones complejas del  $\beta$ A a nivel celular.

# CAPÍTULO III

## **Modulación del receptor $\alpha 7$ por calcio extracelular**



La modulación de los pLGICS por cationes divalentes podría jugar un rol importante en su regulación en un contexto fisiológico. Iones como el calcio o zinc influyen la actividad de los pLGICS ya sea potenciándolos o inhibiéndolos (Zimmermann *et al.*, 2012). Por ejemplo, el ion  $\text{Ca}^{2+}$  potencia las respuestas de agonista de los nAChRs neuronales (Sine *et al.*, 1990; Mulle *et al.*, 1992; Vernino *et al.*, 1992) e inhibe las de los 5HT<sub>3</sub>Rs (Eiselé *et al.*, 1993; Niemeyer y Lummis, 2001) o nAChRs musculares (Vernino *et al.*, 1992).

Uno de los primeros moduladores de la actividad de  $\alpha 7$  frente a ACh descubiertos fue el ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Los receptores neuronales  $\alpha 7$  en hipocampo, además de su alta permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ , también son sensibles a cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ), el cual puede actuar a concentraciones fisiológicas para modular la afinidad de  $\alpha 7$  por ACh, la cooperatividad entre sitios de unión para ACh, la rectificación de las corrientes de entrada y la fase de decaimiento de las corrientes de  $\alpha 7$  (Bonfante-Cabarcas *et al.*, 1996; Albuquerque *et al.*, 1997; Corradi y Bouzat, 2016).

La acción alostérica del  $\text{Ca}^{2+}$  ocurriría por la interacción con el receptor en un sitio(s) en el dominio extracelular de algunos pLGICS (Eiselé *et al.*, 1993; Bonfante-Cabarcas *et al.*, 1996). La mutación del glutamato 237 a alanina (E237A) en  $\alpha 7$ , localizado en el extremo intracelular del poro transmembrana, elimina el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  sin alterar la potenciación por  $\text{Ca}^{2+}$  (Eddins *et al.*, 2002). La mutación del glutamato 172 a glutamina (E172Q), localizado en el dominio N-terminal extracelular, en un receptor quimérico consistente en el dominio extracelular N-terminal de  $\alpha 7$  y los dominios transmembrana y C-terminal de los receptores de 5-HT<sub>3</sub> ( $\alpha 7$ -5HT<sub>3</sub>A), elimina el incremento en la potencia de ACh

causada por  $\text{Ca}^{2+}$  (Galzi *et al.*, 1996). Estos resultados sugieren que la ubicación de los sitios de potenciación por  $\text{Ca}^{2+}$  también son extracelulares en el caso de  $\alpha 7$ .

La amplitud de los picos de corrientes macroscópicas se incrementa en forma dependiente de la concentración cuando la  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  aumenta en neuronas de hipocampo en cultivo (Bonfante-Cabarcas *et al.*, 1996). La acción potenciadora del  $\text{Ca}^{2+}$  se convierte en efectiva por encima de una concentración 0,01 mM, mientras que por encima de 10 mM se inhibe la activación del receptor (Bonfante-Cabarcas *et al.*, 1996). Estos efectos antagónicos son probablemente el resultado de la ocupación secuencial de diferentes sitios (Zimmermann *et al.*, 2012). Por lo tanto, este catión posee un rol importante en la regulación fisiológica de  $\alpha 7$ .

La  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  también incrementa la potencia de agonistas en nAChRs no  $\alpha 7$  presentes en neuronas de la habénula medial, células cromafines y neuronas simpáticas, aunque la potenciación en estos receptores tiene una menor sensibilidad al calcio que en  $\alpha 7$ , con una  $\text{EC}_{50}$  de aproximadamente 2 a 3 mM (Bonfante-Cabarcas *et al.*, 1996).

# OBJETIVOS

Dada la importancia fisiológica que demostró tener la modulación alostérica de los pLGICs por cationes divalentes y la poca información disponible acerca del mecanismo de modulación de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre  $\alpha 7$ , los objetivos del presente capítulo fueron:

- Establecer el efecto de la presencia y la ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular sobre la activación del receptor  $\alpha 7$ , a nivel de corrientes macroscópicas.
- Determinar los cambios a nivel de canal único que expliquen los efectos a nivel de corrientes macroscópicas.

# RESULTADOS

## CAPÍTULO III

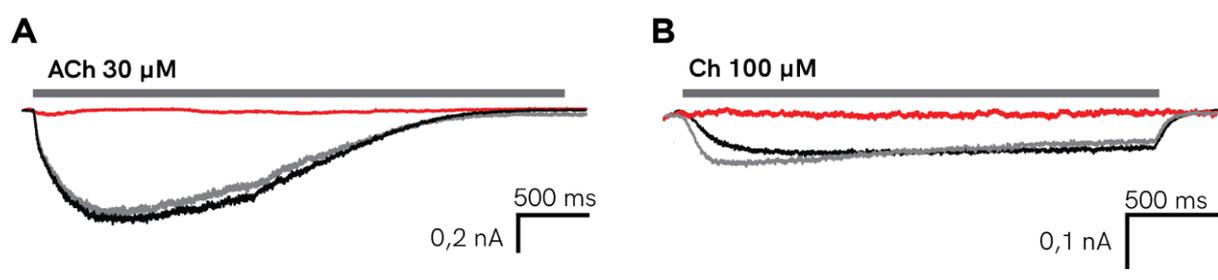


## EFFECTOS DEL CALCIO EXTRACELULAR SOBRE EL PICO DE CORRIENTE Y EL TIEMPO NECESARIO PARA ALCANZARLO

Se realizaron registros de corrientes macroscópicas en la configuración *whole-cell* de *patch clamp* provocadas por perfusión rápida de ACh en la presencia de  $[Ca^{2+}]_e$  1,8 mM, y se compararon con corrientes de la misma célula provocadas por ACh en ausencia de  $Ca^{2+}$  y presencia de EGTA 1mM.

En primer lugar se activó al receptor  $\alpha 7$  con ACh 30  $\mu M$ , una concentración inferior a su  $EC_{50}$  (50 - 60  $\mu M$ , Bartos *et al.*, 2009). En presencia de  $Ca^{2+}$  extracelular, ACh provocó un pico de corriente que decayó durante el pulso de agonista debido a la desensibilización de los receptores (corriente control, figura III.1.A, trazo negro). Cuando la misma célula fue perfundida con la solución de ACh 30  $\mu M$  libre de  $Ca^{2+}$ , las corrientes macroscópicas fueron indetectables (n = 4 células diferentes, figura III.1.A, trazo rojo). La posterior re aplicación de la solución con  $Ca^{2+}$  sobre la misma célula permitió la recuperación del pico de corriente original, descartando por lo tanto que la falta de respuesta se debiera a la pérdida de corriente (figura III.1.A, trazo gris).

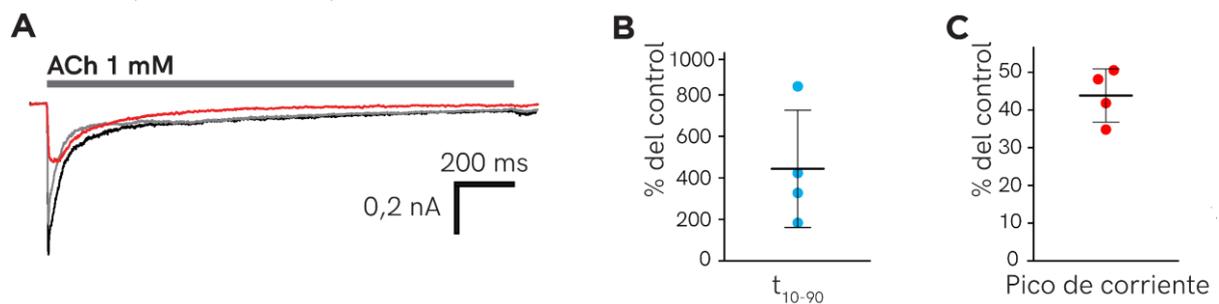
Resultados similares se observaron cuando, en vez de utilizar ACh como



**Figura III. 1** A. Activación de  $\alpha 7$  mediante ACh 30  $\mu M$ . En presencia de calcio (trazo negro) se observa un pico de corriente que desaparece cuando el  $Ca^{2+}$  está ausente en la solución extracelular (trazo rojo) y es recuperado cuando el  $Ca^{2+}$  vuelve a estar presente (trazo gris). B. El mismo efecto observado en A se observa al emplear Ch 100  $\mu M$  como agonista.

agonista, se realizó la activación de los receptores con colina (Ch, *choline*) 100  $\mu$ M, siendo esta una concentración menor a la de  $EC_{50}$  ( $EC_{50} = 2,5 - 3$  mM, Murray *et al.*, 2009, figura III.1.B).

Seguidamente se evaluó la contribución del  $Ca^{2+}$  extracelular sobre la respuesta de  $\alpha 7$  realizando registros de corrientes macroscópicas de  $\alpha 7$  en configuración *whole-cell*, provocadas por perfusión rápida de ACh en una concentración saturante (1 mM). La perfusión rápida con una solución conteniendo ACh 1 mM y  $Ca^{2+}$  1,8 mM generó corrientes que alcanzaron el pico máximo en aproximadamente 10 ms (figura III.2A). Como medida de la velocidad aparente de activación se midió el parámetro  $\tau_{10-90}$ , que es el tiempo que transcurre entre el 10% y el 90% del máximo de corriente. En presencia de  $Ca^{2+}$ , este valor fue de  $10,4 \pm 4,6$  ms. Las corrientes decayeron en presencia de ACh por desensibilización de los receptores con una constante de tiempo rápida ( $\tau_{rápida}$ ) que varía entre 30 y 60 ms ( $38,0 \pm 12,7$  ms) y una constante de tiempo lenta ( $\tau_{lenta}$ ) que varía entre 400 y 600 ms ( $498 \pm 100$  ms).



**Figura III.2** A. Activación de  $\alpha 7$  mediante ACh 1mM. En presencia de  $Ca^{2+}$  extracelular (trazo negro) se observa un pico de corriente que disminuye cuando el  $Ca^{2+}$  está ausente en la solución extracelular (trazo rojo) y es recuperado cuando el  $Ca^{2+}$  vuelve a estar presente (trazo gris). B. Porcentaje de aumento en el  $\tau_{10-90}$  cuando la solución extracelular no contiene  $Ca^{2+}$ . C. Porcentaje de reducción del pico de corriente cuando el  $Ca^{2+}$  está ausente en la solución extracelular. Cada punto en B y C representa una célula diferente ( $n=4$ ).

La remoción del  $Ca^{2+}$  de la solución de ACh 1 mM redujo marcadamente el pico de corriente e incrementó el  $\tau_{10-90}$ . En ausencia de  $Ca^{2+}$ , el  $\tau_{10-90}$  se incrementó

a un  $444 \pm 280\%$  (figura II.2A y B) y el pico de corriente se redujo a un  $43,8 \pm 7,0\%$  (figura II.2A y C) en comparación con la condición control. Además, las corrientes decayeron en forma más lenta en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, determinándose este efecto por el incremento en las constantes de decaimiento:  $\tau_{\text{rápida}}$  tomó un valor de  $99,1 \pm 31,7$  ms, y  $\tau_{\text{lenta}}$  tomó un valor de  $843,1 \pm 671,5$  ms. En todos los casos analizamos únicamente aquellos experimentos en los que el pico de corriente se recuperó en un valor mayor al 85% luego de la ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.

## **VARIACIÓN DE LA AMPLITUD DE LA CORRIENTE UNITARIA EN FUNCIÓN DEL CALCIO EXTRACELULAR**

La magnitud de las corrientes macroscópicas ( $I_m$ ) se define según la ecuación

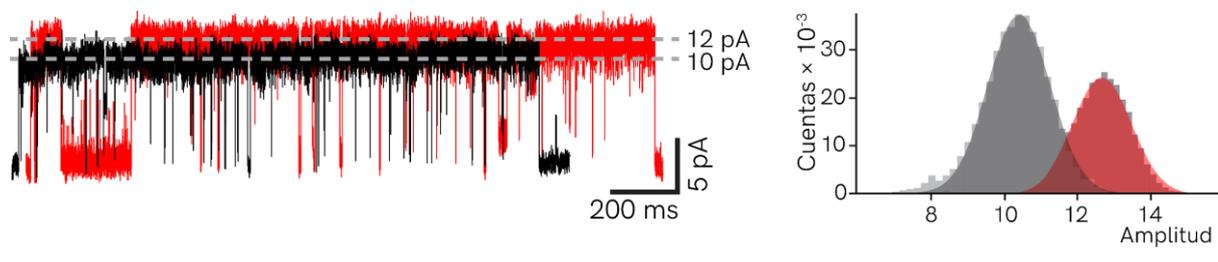
$$I_m = n i P_{\text{apertura}} \quad (\text{Ecuación III.1})$$

siendo  $n$  el número de canales presentes,  $i$  la corriente unitaria al potencial de membrana evaluado medida en pA, y  $P_{\text{apertura}}$  la probabilidad de apertura de los canales.

Dado que, al realizarse el intercambio rápido de soluciones sobre la misma célula el número de canales presentes ( $n$ ) no varía tanto en presencia como en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , la disminución de la corriente macroscópica en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  podría deberse a una disminución de la corriente individual de cada canal o a un descenso de la probabilidad de apertura de los canales. Para identificar cuál de estos dos mecanismos es el responsable de este efecto, se aplicó la técnica de *patch clamp* en la configuración *cell-attached*.

Se determinó la conductancia individual de los canales realizando registros de canal único activando los receptores con ACh 100  $\mu\text{M}$  y el potenciador PNU-120596 1  $\mu\text{M}$  en presencia y ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Como se describió anteriormente, PNU-120596 es un PAM de tipo II que aumenta el tiempo que el canal permanece en el estado abierto luego de abrirse, de manera que la amplitud de los eventos individuales puede ser medida con exactitud.

En presencia de una  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  1,8 mM y a un potencial de membrana de -70 mV la amplitud media de las aperturas individuales fue de  $9,8 \pm 1,7$  pA (n=5). Al realizar registros en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y presencia de EGTA 1 mM a -70 mV, la amplitud media de los canales aumentó a  $12,1 \pm 0,3$  pA (n=3). Por lo tanto, estos resultados descartan una disminución en la conductancia de los canales como mecanismo de la disminución de la magnitud de la corriente macroscópica.



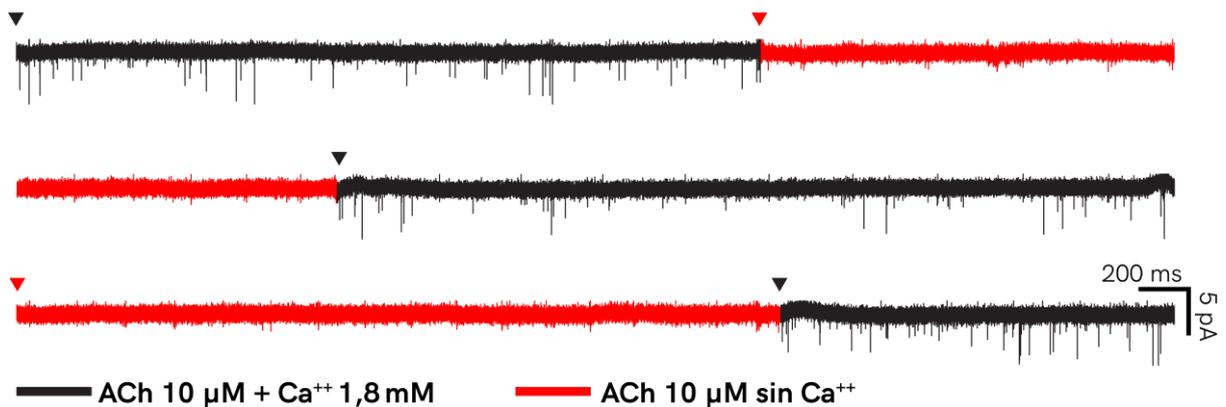
**Figura III.3** Comparación de la amplitud de dos *clusters* representativos en presencia (*cluster negro*) y ausencia (*cluster rojo*) de  $\text{Ca}^{2+}$ . Los mismos fueron provocados por ACh 100  $\mu\text{M}$  y potenciados por PNU-120596 1  $\mu\text{M}$ . A la izquierda se muestran sobre el mismo eje dos histogramas de puntos representativos de los estados abiertos de dos *clusters*, uno en presencia (ajuste negro) y otro en ausencia (ajuste rojo) de  $\text{Ca}^{2+}$ .

## EFFECTO DE LA AUSENCIA DE CALCIO EXTRACELULAR SOBRE LA ACTIVIDAD DE CANAL ÚNICO

Para seguir descifrando en detalle el mecanismo de los cambios macroscópicos en la ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, se realizaron registros de canal único en la

configuración *outside-out*. La activación del receptor  $\alpha 7$  se realizó mediante una perfusión rápida con una concentración baja de ACh ( $10 \mu\text{M}$ ) en presencia y ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . A esta concentración de agonista, las aperturas individuales aparecen como eventos aislados breves.

Sobre el mismo parche se realizó el intercambio rápido de la solución que contenía  $\text{Ca}^{2+}$  en concentración  $1,8 \text{ mM}$  por otra carente de  $\text{Ca}^{2+}$  y con EGTA  $1 \text{ mM}$ . Esto llevó a una reducción muy marcada en el número de eventos de apertura individuales, que llegaron incluso a ser indetectables en algunos sellos. El número de eventos de apertura en ambas condiciones, para el mismo parche, se redujo en un  $92,3 \pm 9,1 \%$  cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  fue removido de la solución de agonista ( $n=4$ , figura III.4).



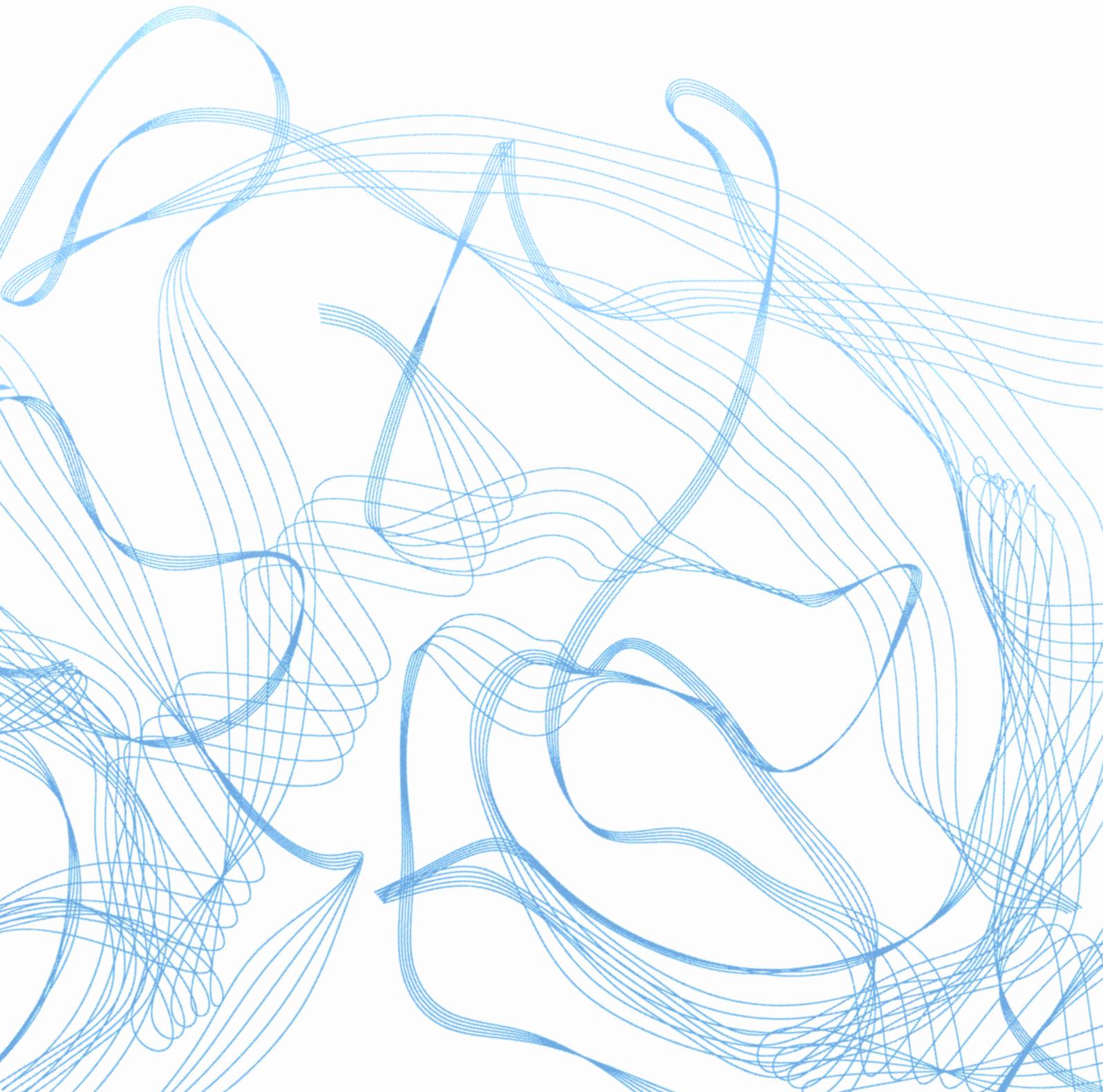
**Figura III.4** Registro de *patch clamp* de canal único en la configuración *outside-out* en el que se observa la activación de  $\alpha 7$  mediante ACh  $10 \mu\text{M}$ . La actividad disminuye marcadamente cuando se intercambia la solución que contiene  $\text{Ca}^{2+}$   $1,8 \text{ mM}$  (tramos negros del trazo) por una en la que el  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentra ausente (tramos rojos del trazo). Las flechas indican el cambio de solución. Al tratarse de la configuración *outside-out*, en este caso los episodios aparecen como deflexiones de la línea de base «hacia abajo». Potencial de membrana:  $-70 \text{ mV}$ .

Al volver a perfundir el mismo parche con la solución original que contenía  $\text{Ca}^{2+}$ , volvieron a detectarse eventos, mostrando que este efecto es reversible. Además, es independiente de si la primera solución aplicada sobre el parche es la que contiene  $\text{Ca}^{2+}$  o la que no posee el catión.

Por lo tanto, se puede concluir que la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en la solución de agonista facilita la activación de  $\alpha 7$  por un aumento de la probabilidad de apertura del canal, lo que explica su rol como modulador alostérico positivo.

# DISCUSIÓN

## CAPÍTULO III



Los resultados mostrados en este capítulo corresponden a una colaboración en progreso entre nuestro laboratorio y el laboratorio del Dr. Sine en la Clínica Mayo, Rochester, USA.

Si bien la acción del  $\text{Ca}^{2+}$  como modulador de los pLGICS parece ser un concepto claramente establecido, resulta curioso que no haya hasta el momento una investigación detallada sobre el mecanismo involucrado, incluso en  $\alpha 7$ .

Los registros de corrientes macroscópicas mostraron que la ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular disminuye el pico máximo de corriente y aumenta el tiempo necesario para alcanzarlo, siendo este efecto reversible. En el caso de concentraciones inferiores a las saturantes, no se detectaron corrientes en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , tanto para la activación con ACh como con Ch. Nuestros resultados están en concordancia con los reportes previos que muestran al  $\text{Ca}^{++}$  como un PAM de  $\alpha 7$  (Mulle *et al.*, 1992; Vernino *et al.*, 1992; Bonfante-Cabarcas *et al.*, 1996; Zimmermann *et al.*, 2012).

Por otra parte, los resultados a nivel de canal único no habían sido mostrados hasta el momento, y nos permitieron revelar el mecanismo involucrado. Como se describió en la ecuación III-1, el pico de amplitud máxima de la corriente macroscópica depende del número de canales, la corriente unitaria ( $G$ ) y la probabilidad de apertura del canal ( $P_{\text{apertura}}$ ). Nuestros experimentos se realizan en la misma célula perfundida con agonista en ausencia y presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo que el número de canales permanece constante, descartándolo como factor de cambio en la ecuación III-1. El aumento en la media de la amplitud individual de los canales determinado en nuestros experimentos en la configuración

*cell-attached* permitió también descartar una disminución en la conductancia de los canales como mecanismo en la disminución del pico de corriente; incluso, encontramos que la conductancia cambia en sentido contrario a lo observado a nivel macroscópico. Por lo tanto, el mecanismo que explicaría la disminución del pico de corriente máxima tendría que involucrar una disminución de la  $P_{\text{apertura}}$  de los canales.

Para comprobar esta hipótesis realizamos registros en configuración *outside-out*, la que permite intercambiar las soluciones de agonista sobre el mismo parche. En estos experimentos utilizamos una concentración baja de ACh para evitar generar corrientes macroscópicas y detectar eventos de apertura individuales y aislados. Observamos una gran disminución del número de eventos de apertura al intercambiar la solución de agonista conteniendo  $\text{Ca}^{2+}$  por una en la que se encontrara ausente, siendo en algunos casos cero. Dado que el número de canales en el parche es constante, la disminución de los eventos de apertura es ocasionada por un gran impedimento del canal para activarse en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Es decir que **el pico de corriente disminuido observado en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en la configuración *whole-cell* se debe a una disminución de la  $P_{\text{apertura}}$  en la ecuación III-1.**

Más aun, dado que la corriente individual aumenta levemente en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , el cambio en la corriente macroscópica no es de una magnitud tan grande como el observado en la frecuencia de aperturas de los registros de *outside-out*. Es decir, el leve aumento de corriente individual compensaría parcialmente la disminución dada por una menor  $P_{\text{apertura}}$ . Es por este motivo que el porcentaje de cambio del  $\tau_{10-90}$  es mucho mayor que el del pico de corriente. Nuestros resultados,

entonces, indican que **el ion  $\text{Ca}^{2+}$  es indispensable para el gatillado del canal.**

Se ha propuesto que los sitios de unión por calcio se encuentran en la región extracelular de  $\alpha 7$  en trabajos con mutaciones dirigidas sobre  $\alpha 7$  (Eddins *et al.*, 2002) o sobre una quimera  $\alpha 7$ -5HT<sub>3</sub>A (Galzi *et al.*, 1996). Parte de nuestro proyecto en colaboración incluye el trabajo con mutantes en la porción extracelular de  $\alpha 7$ , lo que permitirá relacionar estructura y función.

Uno de los roles más importantes del sistema colinérgico en el sistema nervioso central es modular la excitabilidad de las neuronas. La señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  en conjunto con la actividad colinérgica participan en este mecanismo (Vernino *et al.*, 1992). Dado que la modulación por  $\text{Ca}^{2+}$  presentada con nuestros resultados ocurre en el rango fisiológico de concentraciones del catión, la señalización colinérgica modulada por  $\text{Ca}^{2+}$  podría participar en múltiples eventos, siendo entonces de suma importancia en la regulación de esta vía. Este trabajo aporta un primer acercamiento al entendimiento del mecanismo mediante el cual el ion  $\text{Ca}^{2+}$  actúa como PAM del receptor  $\alpha 7$ .

## Referencias

- Absalom NL, Schofield PR, y Lewis TM (2009) Pore structure of the Cys-loop ligand-gated ion channels. *Neurochem Res* **34**:1805–1815.
- Albuquerque EX, Alkondon M, Pereira EF, Castro NG, Schrattenholz A, Barbosa CT, Bonfante-Cabarcas R, Aracava Y, Eisenberg HM, y Maelicke A (1997) Properties of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: pharmacological characterization and modulation of synaptic function. *J Pharmacol Exp Ther* **280**:1117–36.
- Andersen N, Corradi J, Bartos M, Sine SM, y Bouzat C (2011) Functional relationships between agonist binding sites and coupling regions of homomeric Cys-loop receptors. *J Neurosci* **31**:3662–9.
- Andersen N, Corradi J, Sine SM, y Bouzat C (2013) Stoichiometry for activation of neuronal  $\alpha 7$  nicotinic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:20819–24.
- Andersen ND, Nielsen BE, Corradi J, Tolosa MF, Feuerbach D, Arias HR, y Bouzat C (2016) Exploring the Positive Allosteric Modulation of Human  $\alpha 7$  Nicotinic Receptors from a Single-Channel Perspective. *Neuropharmacology* **107**:189–200, Elsevier Ltd.
- Araud T, Graw S, Berger R, Lee M, Neveu E, Bertrand D, y Leonard S (2011) The chimeric gene *CHRFAM7A*, a partial duplication of the *CHRNA7* gene, is a dominant negative regulator of  $\alpha 7$  nAChR function. *Biochem Pharmacol* **82**:904–914.
- Arias HR, Gumilar F, Rosenberg A, Targowska-Duda KM, Feuerbach D, Jozwiak K, Moaddel R, Wainer IW, y Bouzat C (2009) Interaction of Bupropion with Muscle-Type Nicotinic Acetylcholine Receptors in Different Conformational States. *Biochemistry* **48**:4506–4518.
- Bartos M, Corradi J, y Bouzat C (2009) Structural basis of activation of Cys-loop receptors: The extracellular-transmembrane interface as a coupling region. *Mol Neurobiol* **40**:236–252.
- Barz B, y Strodel B (2016) Understanding Amyloid- $\beta$  Oligomerization at the Molecular Level: The Role of the Fibril Surface. *Chem - A Eur J* **22**:8768–8772.
- Benfante R, Antonini RA, De Pizzol M, Gotti C, Clementi F, Locati M, y Fornasari D (2011) Expression of the  $\alpha 7$  nAChR subunit duplicate form (*CHRFAM7A*) is down-regulated in the monocytic cell line THP-1 on treatment with LPS. *J Neuroimmunol* **230**:74–84, Elsevier B.V.
- Bertrand D, Bertrand S, Cassar S, Gubbins E, Li J, y Gopalakrishnan M (2008) Positive Allosteric Modulation of the  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine

- Receptor: Ligand Interactions with Distinct Binding Sites and Evidence for a Prominent Role of the M2-M3 Segment. *Mol Pharmacol* **74**:1407–1416.
- Bitan G, Fradinger EA, Spring SM, y Teplov DB (2005) Neurotoxic protein oligomers--what you see is not always what you get. *Amyloid* **12**:88–95.
- Bonfante-Cabarcas R, Swanson KL, Alkondon M, y Albuquerque EX (1996) Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. IV. Regulation by external Ca<sup>++</sup> of alpha-bungarotoxin-sensitive receptor function and of rectification induced by internal Mg<sup>++</sup>. *J Pharmacol Exp Ther* **277**:432–44.
- Bouzat C (2012) New insights into the structural bases of activation of Cys-loop receptors. *J Physiol Paris* **106**:23–33, Elsevier Ltd.
- Bouzat C, Bartos M, Corradi J, y Sine SM (2008) The Interface between Extracellular and Transmembrane Domains of Homomeric Cys-Loop Receptors Governs Open-Channel Lifetime and Rate of Desensitization. *J Neurosci* **28**:7808–7819.
- Bouzat C, Bren N, y Sine SM (1994) Structural basis of the different gating kinetics of fetal and adult acetylcholine receptors. *Neuron* **13**:1395–1402.
- Bouzat C, Gumilar F, Spitzmaul G, Wang H-L, Rayes D, Hansen SB, Taylor P, y Sine SM (2004) Coupling of agonist binding to channel gating in an ACh-binding protein linked to an ion channel. *Nature* **430**:896–900.
- Bouzat C, Lasala M, Nielsen BE, Corradi J, y Esandi MDC (2018) Molecular function of  $\alpha 7$  nicotinic receptors as drug targets. *J Physiol* **596**:1847–1861.
- Bouzat C, y Mukhtasimova N (2018) The nicotinic acetylcholine receptor as a molecular machine for neuromuscular transmission. *Curr Opin Physiol* **4**:40–48, Elsevier Ltd.
- Bouzat C, y Sine SM (2018) Nicotinic acetylcholine receptors at the single-channel level. *Br J Pharmacol* **175**:1789–1804.
- Brännström K, Islam T, Gharibyan AL, Iakovleva I, Nilsson L, Lee CC, Sandblad L, Pamrén A, y Olofsson A (2018) The Properties of Amyloid- $\beta$  Fibrils Are Determined by their Path of Formation. *J Mol Biol* **430**:1940–1949, Elsevier Ltd.
- Breese CR, Marks MJ, Logel J, Adams CE, Sullivan B, Collins AC, y Leonard S (1997) Effect of smoking history on [3H]nicotine binding in human postmortem brain. *J Pharmacol Exp Ther* **282**:7–13.
- Brejč KK, van Dijk WJWJ, Klaassen R V., Schuurmans M, van der Oost J, Smit AB, y Sixma TK (2001) Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* **411**:269–276.
- Broide RS, y Leslie FM (1999) The  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor in neuronal plasticity. *Mol Neurobiol* **20**:1–16.
- Buckingham SD, Jones AK, Brown LA, y Sattelle DB (2009)

- Nicotinic Acetylcholine Receptor Signalling: Roles in Alzheimer's Disease and Amyloid Neuroprotection. *Pharmacol Rev* **61**:39–61.
- Cacucci F, Yi M, Wills TJ, Chapman P, y O'Keefe J (2008) Place cell firing correlates with memory deficits and amyloid plaque burden in Tg2576 Alzheimer mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:7863–8.
- Castillo M, Mulet J, Gutiérrez LM, Ortiz JA, Castelán F, Gerber S, Sala S, Sala F, y Criado M (2005) Dual role of the RIC-3 protein in trafficking of serotonin and nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* **280**:27062–8.
- Chang YC, Wu W, Zhang JL, y Huang Y (2009) Allosteric activation mechanism of the cys-loop receptors. *Acta Pharmacol Sin* **30**:663–672.
- Chatzidaki A, y Millar NS (2015) Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol* **97**:408–417, Elsevier Inc.
- Chimienti F, Hogg RC, Plantard L, Lehmann C, Brakch N, Fischer J, Huber M, Bertrand D, y Hohl D (2003) Identification of SLURP-1 as an epidermal neuromodulator explains the clinical phenotype of Mal de Meleda. *Hum Mol Genet* **12**:3017–3024.
- Chini B, Raimond E, Elgoyhen AB, Moralli D, Balzaretto M, y Heinemann S (1994) Molecular cloning and chromosomal localization of the human  $\alpha 7$ -nicotinic receptor subunit gene (chrna7).
- Collins-Praino LE, Francis YI, Griffith EY, Wiegman AF, Urbach J, Lawton A, Honig LS, Cortes E, Vonsattel JPG, Canoll PD, Goldman JE, y Brickman AM (2014) Soluble amyloid beta levels are elevated in the white matter of Alzheimer's patients, independent of cortical plaque severity. *Acta Neuropathol Commun* **2**:1–10.
- Colón-Sáez JO, y Yakel JL (2014) A mutation in the extracellular domain of the  $\alpha 7$  nAChR reduces calcium permeability. *Pflugers Arch* **466**:1571–9.
- Connolly CN, y Wafford KA (2004) The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. *Biochem Soc Trans* **32**:529–34.
- Corradi J, y Bouzat C (2016) Understanding the Bases of Function and Modulation of  $\alpha 7$  Nicotinic Receptors: Implications for Drug Discovery. *Mol Pharmacol* **90**:288–99.
- Costantini TW, Dang X, Coimbra R, Eliceiri BP, Baird A, Costantini TW, Dang X, Coimbra R, Eliceiri BP, y Baird A (2015) CHRFAM7A, a human-specific and partially duplicated  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor gene with the potential to specify a human-specific inflammatory response to injury. *J Leukoc Biol* **97**:2292–2302.
- Couturier S, Bertrand D, Matter JM, Hernandez MC, Bertrand S, Millar N, Valera S, Barkas T, y Ballivet M (1990) A neuronal nicotinic acetylcholine receptor

- subunit ( $\alpha 7$ ) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by  $\alpha$ -BTX. *Neuron* **5**:847–856.
- Criado M, Mulet J, Gerber S, Sala S, y Sala F (2011) Mutants of  $\beta$ -strand  $\beta 3$  and the loop B in the interface between  $\alpha 7$  subunits of a homomeric acetylcholine receptor show functional and pharmacological alterations. *J Neurochem* **118**:968–978.
- daCosta CJB, Free CR, Corradi J, Bouzat C, y Sine SM (2011) Single-channel and structural foundations of neuronal  $\alpha 7$  acetylcholine receptor potentiation. *J Neurosci* **31**:13870–9, NIH Public Access.
- daCosta CJB, Free CR, y Sine SM (2015) Stoichiometry for  $\alpha$ -bungarotoxin block of  $\alpha 7$  acetylcholine receptors. *Nat Commun* **6**:8057. doi: 10.1038/ncomms9057 (2015).
- daCosta CJB, y Sine SM (2013) Stoichiometry for drug potentiation of a pentameric ion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:6595–600.
- Dang X, Eliceiri BP, Baird A, y Costantini TW (2015) CHRFAM7A: a human-specific  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor gene shows differential responsiveness of human intestinal epithelial cells to LPS. *FASEB J* **29**:2292–2302.
- De Jonge WJ, y Ulloa L (2007) The  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. *Br J Pharmacol* **151**:915–929.
- de Lucas-Cerrillo AM, Maldifassi MC, Arnalich F, Renart J, Atienza G, Serantes R, Cruces J, Sánchez-Pacheco A, Andrés-Mateos E, y Montiel C (2011) Function of Partially Duplicated Human  $\alpha 7$  Nicotinic Receptor Subunit CHRFAM7A Gene. *J Biol Chem* **286**:594–606.
- Deutsch SI, Burket JA, Benson AD, y Urbano MR (2016) The 15q13.3 deletion syndrome: Deficient  $\alpha 7$ -containing nicotinic acetylcholine receptor-mediated neurotransmission in the pathogenesis of neurodevelopmental disorders. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* **64**:109–117.
- Dineley KT (2007) Beta-amyloid peptide – nicotinic acetylcholine receptor interaction: the two faces of health and disease. *Front Biosci A J Virtual Libr* **12**:5030–5038, Cambridge University Press, Cambridge.
- Dineley KT, Bell KA, Bui D, y Sweatt JD (2002)  $\beta$ -Amyloid peptide activates  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* **277**:25056–25061.
- Dineley KT, Pandya AA, y Yakel JL (2015) Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders. *Trends Pharmacol Sci* **36**:96–108, Elsevier Ltd.
- Drisdel RC, y Green WN (2018) Neuronal  $\alpha$ -Bungarotoxin Receptors Are  $\alpha 7$  Subunit Homomers. *J Neurosci* **20**:133–139.
- Echeverria V, Yarkov A, y Aliev G (2016) Positive modulators of the  $\alpha 7$  nicotinic receptor against neuroinflammation and cognitive impairment in

- Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* **144**:142–157, Elsevier Ltd.
- Eddins D, Lyford LK, Lee JW, Desai SA, y Rosenberg RL (2002) Permeant but not impermeant divalent cations enhance activation of nondesensitizing  $\alpha 7$  nicotinic receptors. *Am J Physiol Physiol* **282**:C796–C804.
- Eiselé J-L, Bertrand S, Galzi J-L, Devillers-Thiéry A, Changeux J-P, y Bertrand D (1993) Chimaeric nicotinic-serotonergic receptor combines distinct ligand binding and channel specificities. *Nature* **366**:479–483.
- Esparza TJ, Wildburger NC, Jiang H, Gangolli M, Cairns NJ, Bateman RJ, y Brody DL (2016) Soluble amyloid-beta aggregates from human Alzheimer's disease brains. *Sci Rep* **6**:1–16, Nature Publishing Group.
- Esparza TJ, Zhao H, Cirrito JR, Cairns NJ, Bateman RJ, Holtzman DM, y Brody DL (2013) Amyloid-beta oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls. *Ann Neurol* **73**:104–119.
- Espinoza-Fonseca LM (2004) Base docking model of the homomeric  $\alpha 7$  nicotinic receptor-beta-amyloid(1-42) complex. *Biochem Biophys Res Commun* **320**:587–91.
- Fabiani C, Murray AP, Corradi J, y Antollini SS (2018) A novel pharmacological activity of caffeine in the cholinergic system. *Neuropharmacology* **135**:464–473, Elsevier Ltd.
- Fernández Nieves GA, Barrantes FJ, y Antollini SS (2008) Modulation of nicotinic acetylcholine receptor conformational state by free fatty acids and steroids. *J Biol Chem* **283**:21478–86.
- Flomen RH, Collier DA, Osborne S, Munro J, Breen G, St. Clair D, y Makoff AJ (2006) Association study of CHRFAM7A copy number and 2bp deletion polymorphisms with schizophrenia and bipolar affective disorder. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* **141**:571–575.
- Freedman R, Adams CE, y Leonard S (2000) The  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor and the pathology of hippocampal interneurons in schizophrenia. *J Chem Neuroanat* **20**:299–306.
- Galzi J-L, Devillers-Thiéry A, Hussy N, Bertrand S, Changeux J-P, y Bertrand D (1992) Mutations in the channel domain of a neuronal nicotinic receptor convert ion selectivity from cationic to anionic. *Nature* **359**:500–505.
- Galzi JL, Bertrand S, Corringer PJ, Changeux JP, y Bertrand D (1996) Identification of calcium binding sites that regulate potentiation of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *EMBO J* **15**:5824–32.
- Gault J, Robinson M, Berger R, Drebing C, Logel J, Hopkins J, Moore T, Jacobs S, Meriwether J, Choi MJ, Kim EJ, Walton K, Buiting K, Davis A, Breese C, Freedman R, y Leonard S (1998) Genomic Organization and Partial Duplication of the Human  $\alpha 7$  Neuronal Nicotinic

- Acetylcholine Receptor Gene (CHRNA7). *Genomics* **52**:173–185.
- Gee VJ, Kracun S, Cooper ST, Gibb AJ, y Millar NS (2007) Identification of domains influencing assembly and ion channel properties in alpha 7 nicotinic receptor and 5-HT3 receptor subunit chimaeras. *Br J Pharmacol* **152**:501–12.
- Gill JK, Chatzidaki A, Ursu D, Sher E, y Millar NS (2013) Contrasting Properties of  $\alpha$ 7-Selective Orthosteric and Allosteric Agonists Examined on Native Nicotinic Acetylcholine Receptors. *PLoS One* **8**.
- Gill JK, Dhankher P, Sheppard TD, Sher E, y Millar NS (2012) A series of  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptor allosteric modulators with close chemical similarity but diverse pharmacological properties. *Mol Pharmacol* **81**:710–8.
- Gill JK, Savolainen M, Young GT, Zwart R, Sher E, y Millar NS (2011) Agonist activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors via an allosteric transmembrane site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:5867–5872.
- Giuffrida ML, Caraci F, Pignataro B, Cataldo S, De Bona P, Bruno V, Molinaro G, Pappalardo G, Messina A, Palmigiano A, Garozzo D, Nicoletti F, Rizzarelli E, y Copani A (2009) Beta-amyloid monomers are neuroprotective. *J Neurosci* **29**:10582–7.
- Gotti C, Briscini L, Verderio C, Oortgiesen M, Balestra B, y Clementi F (1995) Native nicotinic acetylcholine receptors in human Imr32 neuroblastoma cells: functional, immunological and pharmacological properties. *Eur J Neurosci* **7**:2083–2092.
- Grønlien JH, Håkerud M, Ween H, Thorin-hagene K, Briggs CA, Gopalakrishnan M, Malysz J, Halvard J, Håkerud M, Ween H, Thorin-hagene K, Briggs CA, Gopalakrishnan M, Malysz J, Park A, Illinois CAB, Grønlien JH, Håkerud M, Ween H, Thorin-hagene K, Briggs CA, Gopalakrishnan M, Malysz J, Halvard Grønlien J, Hakerud M, Ween H, Thorin-hagene K, Briggs CA, Gopalakrishnan M, y Malysz J (2007) Distinct profiles of alpha7 nAChR positive allosteric modulation revealed by structurally diverse chemotypes. *Mol Pharmacol* **72**:715–24.
- Gu S, Matta JAA, Lord B, Harrington AWW, Sutton SWW, Davini WBB, y Bredt DSS (2016) Brain  $\alpha$ 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Assembly Requires NACHO. *Neuron* **89**:948–955, Elsevier Inc.
- Guan ZZ, Zhang X, Ravid R, y Nordberg A (2000) Decreased protein levels of nicotinic receptor subunits in the hippocampus and temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* **74**:237–43.
- Harrigan MR, Kunkel DD, Nguyen LB, y Malouf AT (1995) Beta amyloid is neurotoxic in hippocampal slice cultures. *Neurobiol Aging* **16**:779–789.
- Harrison PJ, y Weinberger DR (2005) Schizophrenia genes,

- gene expression, and neuropathology: On the matter of their convergence. *Mol Psychiatry* **10**:40–68.
- Hascup KN, y Hascup ER (2016) Soluble Amyloid- $\beta$ 42 Stimulates Glutamate Release through Activation of the  $\alpha$ 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor. *J Alzheimers Dis* **53**:337–47.
- Hayden EY, y Teplow DB (2013) Amyloid  $\beta$ -protein oligomers and Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* **5**:60.
- Hurst RS, Hajós M, Raggenbass M, Wall TM, Higdon NR, Lawson J a, Rutherford-Root KL, Berkenpas MB, Hoffmann WE, Piotrowski DW, Groppi VE, Allaman G, Ogier R, Bertrand S, Bertrand D, y Arneric SP (2005) A novel positive allosteric modulator of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor: in vitro and in vivo characterization. *J Neurosci* **25**:4396–4405.
- Inestrosa NC, Godoy JA, Vargas JY, Arrazola MS, Rios JA, Carvajal FJ, Serrano FG, y Farias GG (2013) Nicotine prevents synaptic impairment induced by amyloid- $\beta$  oligomers through  $\alpha$ 7-nicotinic acetylcholine receptor activation. *NeuroMolecular Med* **15**:549–569.
- Jones I, y Wonnacott S (2004) Precise Localization of 7 Nicotinic Acetylcholine Receptors on Glutamatergic Axon Terminals in the Rat Ventral Tegmental Area. *J Neurosci* **24**:11244–11252.
- Kabbani N, Nordman JC, Corgiat BA, Veltri DP, Shehu A, Seymour VA, y Adams DJ (2013) Are nicotinic acetylcholine receptors coupled to G proteins? *BioEssays* **35**:1025–1034.
- Kadir A, Almkvist O, Wall A, Långström B, y Nordberg A (2006) PET imaging of cortical 11C-nicotine binding correlates with the cognitive function of attention in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology (Berl)* **188**:509–20.
- Kalamida D, Poulas K, Avramopoulou V, Fostieri E, Lagoumintzis G, Lazaridis K, Sideri A, Zouridakis M, y Tzartos SJ (2007) Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors: Structure, function and pathogenicity. *FEBS J* **274**:3799–3845.
- Kandel E, Schwartz J, y Jessell T (2000) *Principles Of Neural Science*, 4ta ed., McGraw-Hill, New York.
- Kelley SP, Dunlop JI, Kirkness EF, Lambert JJ, y Peters JA (2003) A cytoplasmic region determines single-channel conductance in 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Nature* **424**:321–324.
- Khan GM, Tong M, Jhun M, Arora K, y Nichols RA (2010)  $\beta$ -Amyloid activates presynaptic  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptors reconstituted into a model nerve cell system: involvement of lipid rafts. *Eur J Neurosci* **31**:788–796.
- Kumar A, Singh A, y Ekavali (2015) A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: An update. *Pharmacol Reports* **67**:195–203, Institute of Pharmacology,

- Polish Academy of Sciences.
- Kunii Y, Zhang W, Xu Q, Hyde TM, McFadden W, Shin JH, Deep-Soboslay A, Ye T, Li C, Kleinman JE, Wang KH, y Lipska BK (2015) CHRNA7 and CHRFA7A mRNAs: Co-localized and their expression levels altered in the postmortem dorsolateral prefrontal cortex in major psychiatric disorders. *Am J Psychiatry* **172**:1122–1130.
- Lacor PN, Buniel MC, Chang L, Fernandez SJ, Gong Y, Viola KL, Lambert MP, Velasco PT, Bigio EH, Finch CE, Krafft GA, y Klein WL (2004) Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci* **24**:10191–200.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680–5.
- Langley JN (1905) On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari. *J Physiol* **33**:374–413.
- Lasala M, Corradi J, Bruzzone A, Esandi MDC, y Bouzat C (2018) A human-specific, truncated  $\alpha 7$  nicotinic receptor subunit assembles with full-length  $\alpha 7$  and forms functional receptors with different stoichiometries. *J Biol Chem* **293**:10707–10717.
- Le Novère N, y Changeux JP (2001) LGICdb: the ligand-gated ion channel database. *Nucleic Acids Res* **29**:294–5.
- Le Novère N, Corringer PJ, y Changeux JP (2002) The diversity of subunit composition in nAChRs: Evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J Neurobiol* **53**:447–456.
- Lendvai B, Kassai F, Szájlí A, y Némethy Z (2013)  $\alpha 7$  Nicotinic acetylcholine receptors and their role in cognition. *Brain Res Bull* **93**:86–96, Elsevier Inc.
- Li SF, Wu MN, Wang XH, Yuan L, Yang D, y Qi JS (2011) Requirement of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors for amyloid beta protein-Induced depression of hippocampal long-term potentiation in CA1 region of rats in vivo. *Synapse* **65**:1136–1143.
- Liu Q, Kawai H, y Berg DK (2001) beta -Amyloid peptide blocks the response of alpha 7-containing nicotinic receptors on hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:4734–9.
- Liu Q, Xie X, Emadi S, Sierks MR, y Wu J (2015) A novel nicotinic mechanism underlies  $\beta$ -amyloid-induced neurotoxicity. *Neuropharmacology* **97**:457–463, Elsevier Ltd.
- Locke D, Archidiacono N, Misceo D, Cardone M, Deschamps S, Roe B, Rocchi M, y Eichler E (2003) Refinement of a chimpanzee pericentric inversion breakpoint to a segmental duplication cluster. *Genome Biol* **4**:0.
- Locke DP, Jiang Z, Pertz LM, Misceo D, Archidiacono N, y Eichler EE (2005) Molecular evolution of the human chromosome 15 pericentromeric region. *Cytogenet Genome Res* **108**:73–82.

- Ma KG, y Qian YH (2018) Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor and its effects on Alzheimer's disease. *Neuropeptides* 0–1, Elsevier.
- Maelicke A, y Albuquerque EX (2000) Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *c*:165–170.
- McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, y Masters CL (1999) Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **46**:860–6.
- Miller PS, y Smart TG (2010) Binding, activation and modulation of Cys-loop receptors. *Trends Pharmacol Sci* **31**:161–174, Elsevier Ltd.
- Miyazawa A, Fujiyoshi Y, y Unwin N (2003) Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* **423**:949–955.
- Monod J, Wyman J, y Changeux JP (1965) On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J Mol Biol* **12**:88–118.
- Morales-perez CL, Noviello CM, y Hibbs RE (2016) X-ray structure of the human  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptor. *Nat Publ Gr*, doi: 10.1038/nature19785, Nature Publishing Group.
- Mulle C, Léna C, y Changeux JP (1992) Potentiation of nicotinic receptor response by external calcium in rat central neurons. *Neuron* **8**:937–945.
- Müller UC, Deller T, y Korte M (2017) Not just amyloid: Physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nat Rev Neurosci* **18**:281–298, Nature Publishing Group.
- Mura E, Zappettini S, Preda S, Biundo F, Lanni C, Grilli M, Cavallero A, Olivero G, Salamone A, Govoni S, y Marchi M (2012) Dual Effect of Beta-Amyloid on  $\alpha 7$  and  $\alpha 4\beta 2$  Nicotinic Receptors Controlling the Release of Glutamate, Aspartate and GABA in Rat Hippocampus. *PLoS One* **7**:e29661.
- Murray T a, Bertrand D, Papke RL, George A a, Pantoja R, Srinivasan R, Liu Q, Wu J, Whiteaker P, Lester H a, y Lukas RJ (2012) A7B2 Nicotinic Acetylcholine Receptors Assemble, Function, and Are Activated Primarily Via Their A7-A7 Interfaces. *Mol Pharmacol* **81**:175–88.
- Murray TA, Liu Q, Whiteaker P, Wu J, y Lukas RJ (2009) Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  subunits with a C2 cytoplasmic loop yellow fluorescent protein insertion form functional receptors. *Acta Pharmacol Sin* **30**:828–841.
- Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, Castellani RJ, Crain BJ, Davies P, Tredici K Del, Duyckaerts C, Frosch MP, Haroutunian V, Hof PR, Hulette CM, Hyman BT, Iwatsubo T, Jellinger KA, Jicha GA, Kövari E, Kukull WA, Leverenz JB, Love S, MacKenzie IR, Mann DM, Masliah E, McKee AC, Montine TJ, Morris

- JC, Schneider JA, Sonnen JA, Thal DR, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Wisniewski T, Woltjer RL, y Beach TG (2012) Correlation of alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: A review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol* **71**:362–381.
- Neri M, Bonassi S, y Russo P (2012) Genetic variations in CHRNA7 or CHRFA7 and susceptibility to dementia. *Curr Drug Targets* **13**:636–43.
- Nielsen BE, Minguez T, Bermudez I, y Bouzat C (2018) Molecular function of the novel  $\alpha 7\beta 2$  nicotinic receptor. *Cell Mol Life Sci* **75**:2457–2471, Springer International Publishing.
- Niemeyer MI, y Lummis SCR (2001) The role of the agonist binding site in  $\text{Ca}^{2+}$  inhibition of the recombinant 5-HT<sub>3A</sub> receptor. *Eur J Pharmacol* **428**:153–161.
- Noguchi A, Matsumura S, Dezawa M, Tada M, Yanazawa M, Ito A, Akioka M, Kikuchi S, Sato M, Ideno S, Noda M, Fukunari A, Muramatsu S, Itokazu Y, Sato K, Takahashi H, Teplow DB, Nabeshima Y, Kakita A, Imahori K, y Hoshi M (2009) Isolation and characterization of patient-derived, toxic, high mass amyloid beta-protein (A $\beta$ ) assembly from Alzheimer disease brains. *J Biol Chem* **284**:32895–905.
- Nordman JC, y Kabbani N (2012) An interaction between  $\alpha 7$  nicotinic receptors and a G-protein pathway complex regulates neurite growth in neural cells. *J Cell Sci* **125**:5502–13.
- Ono K, Condron MM, y Teplow DB (2009) Structure-neurotoxicity relationships of amyloid beta-protein oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:14745–50.
- Paas Y, Gibor G, Grailhe R, Savatier-Duclert N, Dufresne V, Sunesen M, de Carvalho LP, Changeux J-P, y Attali B (2005) Pore conformations and gating mechanism of a Cys-loop receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:15877–15882.
- Palczynska MM, Jindrichova M, Gibb AJ, Millar NS, Pałczyńska MM, Jindrichova M, Gibb AJ, Millar NS, Pałczyńska MM, Jindrichova M, Gibb AJ, y Millar NS (2012) Activation of  $\alpha 7$  nicotinic receptors by orthosteric and allosteric agonists: influence on single-channel kinetics and conductance. *Mol Pharmacol* **82**:910–917.
- Palma E, Bertrand S, Binzoni T, y Bertrand D (1996) Neuronal nicotinic  $\alpha 7$  receptor expressed in *Xenopus* oocytes presents five putative binding sites for methyllycaconitine. *J Physiol* **491**:151–161.
- Palop JJ, y Mucke L (2010) Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci* **13**:812–8.
- Pandya A, y Yakel JL (2011) Allosteric modulator desformylflustrabromine relieves the inhibition of  $\alpha 2\beta 2$  and  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptors by  $\beta$ -amyloid 1-42 peptide. *J Mol Neurosci* **45**:42–

- 47.
- Parihar MS, y Brewer GJ (2011) *Amyloid Beta as a Modulator of Synaptic Plasticity*.
- Parri HR, Hernandez CM, y Dineley KT (2011) Research update: Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor mechanisms in Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* **82**:931–942.
- Pascual AC, Gaveglione VL, Giusto NM, y Pasquaré SJ (2017) 2-Arachidonoylglycerol metabolism is differently modulated by oligomeric and fibrillar conformations of amyloid beta in synaptic terminals. *Neuroscience* **362**:168–180.
- Pear WS, Nolan GP, Scott ML, y Baltimore D (1993) Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:8392–6.
- Perillo VL, Fernández-Nievas GA, Vallés AS, Barrantes FJ, y Antollini SS (2012) The position of the double bond in monounsaturated free fatty acids is essential for the inhibition of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1818**:2511–2520.
- Pettit DL, Shao Z, y Yakel JL (2001)  $\beta$ -Amyloid(1-42) peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice. *J Neurosci* **21**:NIL\_10-NIL\_14.
- Puskar NL, Xiu X, Lester HA, y Dougherty DA (2011) Two neuronal nicotinic acetylcholine receptors,  $\alpha$ 4 $\beta$ 4 and  $\alpha$ 7, show differential agonist binding modes. *J Biol Chem* **286**:14618–14627.
- Puzzo D, Gulisano W, Arancio O, y Palmeri A (2015) The keystone of Alzheimer pathogenesis might be sought in A $\beta$  physiology. *Neuroscience* **307**:26–36.
- Rayes D, De Rosa MJ, Sine SM, y Bouzat C (2009) Number and locations of agonist binding sites required to activate homomeric Cys-loop receptors. *J Neurosci* **29**:6022–32.
- Reitz C, y Mayeux R (2014) Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol* **88**:640–51.
- Riley B, Williamson M, Collier D, Wilkie H, y Makoff A (2002) A 3-Mb map of a large Segmental duplication overlapping the alpha7-nicotinic acetylcholine receptor gene (CHRNA7) at human 15q13-q14. *Genomics* **79**:197–209.
- Sadigh-Eteghad S, Talebi M, Farhoudi M, Golzari SEJ, Sabermarouf B, y Mahmoudi J (2014) Beta-amyloid exhibits antagonistic effects on alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors in orchestrated manner. *J Med Hypotheses Ideas* **8**:49–52, Tehran University of Medical Sciences.
- Sali A, y Blundell TL (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* **234**:779–815.
- Santos AN, Ewers M, Minthon L, Simm A, Silber R-E, Blennow K, Prvulovic D, Hansson O, y Hampel H (2012) Amyloid- $\beta$

- Oligomers in Cerebrospinal Fluid are Associated with Cognitive Decline in Patients with Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis* **29**:171–176.
- Sauguet L, Shahsavari A, y Delarue M (2015) Crystallographic studies of pharmacological sites in pentameric ligand-gated ion channels. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* **1850**:511–523, Elsevier B.V.
- Schaaf CP (2014) Nicotinic acetylcholine receptors in human genetic disease. *Genet Med* **16**:649–56.
- Schmidt J, y Raftery MA (1973) Purification of Acetylcholine Receptors from Torpedo californica Electroplex by Affinity Chromatography. *Biochemistry* **12**:852–856.
- Séguéla P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, y Patrick JW (1993) Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci* **13**:596–604.
- Selkoe DJ (2001) Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Perspective* **81**:741–767.
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, y Selkoe DJ (2008) Amyloid- $\beta$  protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* **14**:837–842.
- Sine SM, Claudio T, y Sigworth FJ (1990) Activation of Torpedo acetylcholine receptors expressed in mouse fibroblasts. Single channel current kinetics reveal distinct agonist binding affinities. *J Gen Physiol* **96**:395–437.
- Sine SM, y Engel AG (2006) Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature* **440**:448–455.
- Sinkus ML, Graw S, Freedman R, Ross RG, Lester H a., y Leonard S (2015) The human CHRNA7 and CHRFBAM7A genes: A review of the genetics, regulation, and function. *Neuropharmacology* **96**:274–288, Elsevier Ltd.
- Sinkus ML, Lee MJ, Gault J, Logel J, Short M, Freedman R, Christian SL, Lyon J, y Leonard S (2009) A 2-base pair deletion polymorphism in the partial duplication of the alpha7 nicotinic acetylcholine gene (CHRFBAM7A) on chromosome 15q14 is associated with schizophrenia. *Brain Res* **1291**:1–11.
- Spurny R, Debaveye S, Farinha A, Veys K, Vos AM, Gossas T, Attack J, Bertrand S, Bertrand D, Danielson UH, Tresadern G, y Ulens C (2015) Molecular blueprint of allosteric binding sites in a homologue of the agonist-binding domain of the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci* **112**:E2543–E2552.
- Stephens SH, Franks A, Berger R, Palionyte M, Fingerlin TE, Wagner B, Logel J, Olincy A, Ross RG, Freedman R, y Leonard S (2012) Multiple genes

- in the 15q13-q14 chromosomal region are associated with schizophrenia. *Psychiatr Genet* **22**:1–14.
- Stuckenholz V, Bacher M, Balzer-Geldsetzer M, Alvarez-Fischer D, Oertel WH, Dodel RC, y Noelker C (2013) The  $\alpha 7$  nAChR agonist PNU-282987 reduces inflammation and MPTP-induced nigral dopaminergic cell loss in mice. *J Parkinsons Dis* **3**:161–72.
- Sun Y, Wang B, Ge X, y Ding F (2017) Distinct oligomerization and fibrillization dynamics of amyloid core sequences of amyloid-beta and islet amyloid polypeptide. *Phys Chem Chem Phys* **19**:28414–28423.
- Taly A, Corringer PJ, Guedin D, Lestage P, y Changeux JP (2009) Nicotinic receptors: Allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov* **8**:733–750, Nature Publishing Group.
- Terry A V., Callahan PM, y Bertrand D (2015) R-(+) and S-(-) Isomers of Cotinine Augment Cholinergic Responses In Vitro and In Vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **352**:405–418.
- Thompson AJ, Lester H a, y Lummis SCR (2010) *The structural basis of function in Cys-loop receptors.*
- Timmermann DB, Grønlien JH, Kohlhaas KL, Nielsen EØ, Dam E, Jørgensen TD, Ahring PK, Peters D, Holst D, Chrsitensen JK, Malysz J, Briggs C a, Gopalakrishnan M, y Olsen GM (2007) An Allosteric Modulator of the  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptor Possessing Cognition-Enhancing Properties in Vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **323**:294–307.
- Tong M, Arora K, White MM, y Nichols RA (2011) Role of key aromatic residues in the ligand-binding domain of  $\alpha 7$  nicotinic receptors in the agonist action of  $\beta$ -amyloid. *J Biol Chem* **286**:34373–34381.
- Tsetlin V, Kryukova E, Shelukhina I, Skok M, Volpina O, Burbaeva G, Utkin Y, y Starodubtseva L (2007) Detection of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors with the aid of antibodies and toxins. *Life Sci* **80**:2202–2205, Elsevier Inc.
- Unwin N (2005) Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution. *J Mol Biol* **346**:967–989.
- Uranga RM, Alza NP, Conde MA, Antollini SS, y Salvador GA (2016) Phosphoinositides: Two-Path Signaling in Neuronal Response to Oligomeric Amyloid  $\beta$  Peptide. *Mol Neurobiol* **54**:3236–3252, Molecular Neurobiology.
- Uranga RM, Giusto NM, y Salvador GA (2010) Effect of transition metals in synaptic damage induced by amyloid beta peptide. *Neuroscience* **170**:381–389, Elsevier Inc.
- Uteshev V V. (2014) The therapeutic promise of positive allosteric modulation of nicotinic receptors. *Eur J Pharmacol* **727**:181–185.
- Vernino S, Amador M, Luetje CW, Patrick J, y Dani JA (1992) Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors.

- Neuron* **8**:127–134.
- Villiger Y, Szanto I, Jaconi S, Blanchet C, Buisson B, Krause K-H, Bertrand D, y Romand J (2002) Expression of an alpha7 duplicate nicotinic acetylcholine receptor-related protein in human leukocytes. *J Neuroimmunol* **126**:86–98.
- Wallace TL, y Bertrand D (2013) Alpha7 neuronal nicotinic receptors as a drug target in schizophrenia. *Expert Opin Ther Targets* **17**:139–155.
- Walsh DM, Tseng BP, Rydel RE, Podlisny MB, y Selkoe DJ (2000) The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry* **39**:10831–9.
- Wang H-Y (2000) beta -Amyloid1-42 Binds to alpha 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor with High Affinity. IMPLICATIONS FOR ALZHEIMER'S DISEASE PATHOLOGY. *J Biol Chem* **275**:5626–5632.
- Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ, y Tracey KJ (2003) Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* **421**:384–8.
- Wang Y, Xiao C, Indersmitten T, Freedman R, Leonard S, y Lester HA (2014) The Duplicated  $\alpha 7$  Subunits Assemble and Form Functional Nicotinic Receptors with the Full-length  $\alpha 7$ . *J Biol Chem* **289**:26451–26463.
- Watt AD, Perez KA, Rembach A, Sherrat NA, Hung LW, Johanssen T, McLean CA, Kok WM, Hutton CA, Fodero-Tavoletti M, Masters CL, Villemagne VL, y Barnham KJ (2013) Oligomers, fact or artefact? SDS-PAGE induces dimerization of  $\beta$ -amyloid in human brain samples. *Acta Neuropathol* **125**:549–564.
- Williams ME, Burton B, Urrutia A, Shcherbatko A, Chavez-Noriega LE, Cohen CJ, y Aiyar J (2005) Ric-3 promotes functional expression of the nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit in mammalian cells. *J Biol Chem* **280**:1257–63.
- Wu J, Kuo Y-PP, George AA, Xu L, Hu J, Lukas RJ, Wut J, Kuo Y-PP, George AA, Xu L, Hu J, Lukas RJ, Wu J, Kuo Y-PP, George AA, Xu L, Hu J, y Lukas RJ (2004)  $\beta$ -Amyloid Directly Inhibits Human  $\alpha 4\beta 2$ -Nicotinic Acetylcholine Receptors Heterologously Expressed in Human SH-EP1 Cells. *J Biol Chem* **279**:37842–37851.
- Yan H, Pan N, Xue F, Zheng Y, Li C, Chang Y, Xu Z, Yang H, y Zhang J (2015) The coupling interface and pore domain codetermine the single-channel activity of the  $\alpha 7$  nicotinic receptor. *Neuropharmacology* **95**:448–58, Elsevier Ltd.
- Yang T, Xiao T, Sun Q, y Wang K (2017) The current agonists and positive allosteric modulators of  $\alpha 7$  nAChR for CNS indications in clinical trials. *Acta Pharm Sin B* **7**:611–622, Elsevier B.V.
- Young GT, Zwart R, Walker AS, Sher E, y Millar NS (2008)

- Potentiation of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors via an allosteric transmembrane site. *Proc Natl Acad Sci* **105**:14686–14691.
- Zhang J, Xue F, Liu Y, Yang H, y Wang X (2013) The structural mechanism of the cys-loop receptor desensitization. *Mol Neurobiol* **48**:97–108.
- Zhang Y (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* **9**:1–8.
- Zhang Y, Thompson R, Zhang H, y Xu H (2011) APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain* **4**:3, BioMed Central Ltd.
- Zimmermann I, Marabelli A, Bertozzi C, Sivilotti LG, y Dutzler R (2012) Inhibition of the Prokaryotic Pentameric Ligand-Gated Ion Channel ELIC by Divalent Cations. *PLoS Biol* **10**.

## ABREVIATURAS

5-HT: 5-hidroxitriptamina, serotonina

5-HT3A: subunidad A del receptor de serotonina tipo 3

5-HT3B: subunidad B del receptor de serotonina tipo 3

ACh: *acetylcholine*, acetilcolina

AChBP: *acetylcholine binding protein*, proteína unidora de acetilcolina

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

AMPA: *aminomethylphosponic acid*, ácido aminometilfosfónico

Ch: *choline*, colina

DMEM: *Dubecco's modified Eagle's médium*, medio de Eagle modificado por Dubecco

EC<sub>50</sub>: *effective dosis 50*, dosis efectiva 50

EGTA: *ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid*, ácido etilen glycol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético

G: corriente unitaria al potencial de membrana evaluado

GABA: *gamma-Aminobutyric acid*, ácido gamma-aminobutírico

GFP: *green fluorescente protein*, proteína verde fluorescente

HEPES: *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanesulfónico

$I_m$ : magnitud de corriente macroscópica

kHz: kilohertz

LC: *low conductance*, baja conductancia (referido a la subunidad de receptor)

LGIC: *ligand gated ion channel*, canal iónico activado por ligando

M1-M4: segmentos transmembrana 1 a 4

mAChR: *muscarinic acetylcholine receptor*, receptor muscarínico de acetilcolina

MIL: *maximum interval likelihood*, máximo intervalo de probabilidad

nAChR: *nicotinic acetylcholine receptor*, receptor nicotínico de acetilcolina

NMDA: *n-Methyl-D-aspartate*, n-Metil-D-aspartato

PAM: *positive allosteric modulator*, modulador alostérico positivo

$P_{\text{apertura}}$ : probabilidad de apertura

PBS: *phosphate buffered saline*, buffer fosfato salino

pLGIC: *pentameric ligand gated ion channel*, canal iónico activado por ligando pentamérico

$\alpha$ -Btx:  $\alpha$ -Bungarotoxina

$\beta A_{1-40}$ : péptido  $\beta$ -Amiloide 1-40

$\beta A_{1-42}$ : péptido  $\beta$ -Amiloide 1-42

$\tau_{10-90}$ : tiempo que transcurre entre el 10% y el 90% del máximo de corriente

$\tau_{\text{crit}}$ : tiempo crítico

$\tau_{\text{lenta}}$ : constante de tiempo lenta

$\tau_{\text{rápida}}$ : constante de tiempo rápida

