

Tesis Doctoral

# Receptor nicotínico colinérgico alfa9alfa10: propiedades funcionales y farmacológicas

Boffi, Juan Carlos

2014-03-31

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Boffi, Juan Carlos. (2014-03-31). Receptor nicotínico colinérgico alfa9alfa10: propiedades funcionales y farmacológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Boffi, Juan Carlos. "Receptor nicotínico colinérgico alfa9alfa10: propiedades funcionales y farmacológicas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-03-31.



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

## **Receptor nicotínico colinérgico $\alpha 9\alpha 10$ : propiedades funcionales y farmacológicas.**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área **CIENCIAS BIOLÓGICAS**.

Lic. Juan Carlos Boffi.

Director de tesis: Dra. Ana Belén Elgoyhen.  
Consejero de estudios: Dra. Lidia Szczupak.  
Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones en Ingeniería  
Genética y Biología Molecular “Dr. Hector N. Torres” (INGEBI), CONICET.  
Buenos Aires, 2014.

## Receptor Nicotínico Colinérgico $\alpha 9\alpha 10$ : Propiedades Funcionales y Farmacológicas.

### Resumen.

La activación del receptor nicotínico colinérgico  $\alpha 9\alpha 10$  presente en los contactos sinápticos entre las fibras colinérgicas eferentes olivococleares y las células ciliadas del órgano de Corti puede prevenir el trauma acústico. En consecuencia, incrementar su activación mediante el uso de potenciadores farmacológicos, conocer las condiciones en las cuales este receptor alcanza una activación óptima o estudiar su mecanismo de activación, podría tener un potencial valor terapéutico para la prevención de la pérdida de audición causada por exposición a intensidades altas de sonido. Por lo tanto, los objetivos de este trabajo fueron: caracterizar nuevos moduladores positivos para el receptor  $\alpha 9\alpha 10$ , estudiar las condiciones en las que alcanza una activación óptima y describir los requerimientos estructurales para su activación.

En relación a la búsqueda de potenciadores farmacológicos, en este trabajo caracterizamos al ácido ascórbico (ASC) como modulador positivo de receptores recombinantes  $\alpha 9\alpha 10$  expresados en oocitos de *Xenopus laevis*, mediante fijado de voltaje con dos electrodos. Evidenciamos que la potenciación por ASC de  $\alpha 9\alpha 10$  no afecta la afinidad aparente por acetilcolina (ACh) ni la sensibilidad al voltaje del receptor, pero si incrementa significativamente las amplitudes máximas de corriente evocada. Este efecto es estereoespecífico de la forma L y reducida de ASC. Nuestros resultados sugieren que el mecanismo de potenciación involucraría una interacción alostérica estereoespecífica.

Para caracterizar las condiciones en las cuales el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  alcanza una activación óptima, estudiamos la influencia del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular en la activación del receptor recombinante  $\alpha 9\alpha 10$ . Este receptor es potenciado a concentraciones sub-mM de  $\text{Ca}^{2+}$  y es bloqueado a concentraciones superiores. La incorporación de la subunidad  $\alpha 10$  al pentámero es responsable de la potenciación a concentraciones sub-mM de  $\text{Ca}^{2+}$ . Mediante mutagénesis dirigida y generación de receptores quiméricos, evidenciamos que las interfaces entre los dominios extracelulares de una subunidad  $\alpha 9$  y otra  $\alpha 10$  adyacente son clave en este proceso.

Finalmente, estudiamos el proceso de activación de receptores recombinantes  $\alpha 9\alpha 10$ , caracterizando la importancia de cada subunidad en la formación de sitios de

unión a ACh funcionales. Evidenciamos que los componentes principales del sitio de unión a ACh de tanto las subunidades  $\alpha 9$  como de las  $\alpha 10$  son necesarios para la activación del receptor  $\alpha 9\alpha 10$  y que los componentes complementarios de  $\alpha 9$  son indispensables para este proceso.

Palabras clave: Receptores nicotínicos, acetilcolina, trauma acústico, vitamina C, calcio extracelular, sitio de unión a agonista.

## **$\alpha 9\alpha 10$ Nicotinic Cholinergic Receptor: Functional and Pharmacological Properties.**

### **Abstract.**

The activation of the  $\alpha 9\alpha 10$  nicotinic cholinergic receptor present at the synaptic contacts between efferent olivocochlear cholinergic fibers and hair cells of the organ of Corti can prevent acoustic trauma. In consequence, to enhance its activation by means of a pharmacological potentiator, to know the conditions in which it reaches maximal activation or to study its activation mechanism, could have a potential therapeutic use in the prevention of noise induced hearing loss. Hence, the aims of this work were to characterize new positive modulators of the  $\alpha 9\alpha 10$  receptor, to study the conditions in which it reaches optimal activation and to describe its structural requirements for activation.

Searching for new positive modulators of  $\alpha 9\alpha 10$ , in this work we characterized ascorbic acid (ASC) as a potentiator of recombinant  $\alpha 9\alpha 10$  receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes by two electrode voltage clamp recordings. We evidenced that the potentiation produced by ASC does not affect the receptor's apparent affinity for acetylcholine (ACh) or its voltage sensitivity, but it significantly increases the maximal evoked current amplitudes ( $I_{max}$ ). This effect is stereospecific of the reduced L stereoisomer of ASC. Our results suggest that the potentiation mechanism could involve a stereospecific allosteric interaction.

To characterize the conditions in which the receptor reaches optimal activation, we studied the influence of extracellular  $Ca^{2+}$  on the activation levels of the recombinant  $\alpha 9\alpha 10$  receptor. This receptor is potentiated at sub-mM  $Ca^{2+}$  concentrations and is blocked by higher concentrations. The incorporation of  $\alpha 10$  subunits to the pentamer is responsible for the potentiation observed at sub-mM  $Ca^{2+}$  concentrations. Using site directed mutagenesis and generating chimeric receptors, we evidenced that the interphase between the extracellular domains of adjacent  $\alpha 9$  and  $\alpha 10$  subunits is a key structural determinant in this process.

Finally, we studied the process of activation of recombinant  $\alpha 9\alpha 10$  receptors characterizing the importance of each subunit in the conformation of functional ACh binding sites. We evidenced that the principal components of the ACh binding site provided by both  $\alpha 9$  and  $\alpha 10$  subunits are necessary for the activation of  $\alpha 9\alpha 10$

receptors and that the complementary components provided by  $\alpha 9$  subunits are essential for this process.

Key words: Nicotinic receptors, acetylcholine, acoustic trauma, vitamin C, extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , agonist binding site.

## **Agradecimientos.**

Pasan muchas cosas en cinco años trabajando con las mismas personas. Me alegra que muchas sean muy memorables. Esas cosas te demuestran que por suerte no fueron solo rutina estos años. Ahora tengo que contar todo lo que paso en el laboratorio en este tiempo y me parece un poco incompleto hablar solo de lo académico. Espero no explayarme de más y volver algo cursi esta parte, pero me gustaría aprovechar estas páginas para reconocer lo que pasó en el laboratorio también a nivel humano.

En primer lugar, agradezco al INGEBI y todos sus integrantes, la FCEN, la UBA y el CONICET por el entorno, formación y financiación.

Empecé con mucha confianza, más de la que podía justificar. Les agradezco a Belén en particular y a todos los miembros del labo Elgoyhen haberme tenido paciencia y en especial tolerancia si se justificaba. Aprendí mucho de eso de ustedes. Además de la invaluable oportunidad de formarme en y formar parte de, en mi opinión, uno de los mejores laboratorios del país, te agradezco sinceramente Belén, el no haber perdido la confianza en mí. Ojalá haya estado a la altura de las oportunidades que el laboratorio me dió.

La verdad es que no puedo estar más conforme con mis compañeros de trabajo. Pasamos muy buenos asados, facturas y también hubo discusiones, pero siempre con actitud de seguir funcionando lo mejor posible como grupo. Hoy valoro y respeto mucho esa actitud. Gracias muchachos, aprendí mucho de ustedes como grupo.

En particular me siento muy feliz de la amistad que pudimos formar con Marcela, que fue mi maestra en el día a día de la mesada, el setup y la masticación de resultados y proyectos. Gracias Marce, invertiste desinteresadamente muchísimo tiempo de tu doctorado y postdoctorado en formarme. Aprendí mucho de vos y me llevo una muy buena amiga del doctorado. Gracias también a Marcelo y Andre Beltrán quienes fueron excelentes compañeros en el día a día. Y por supuesto que me alegro de haber tenido el privilegio de conocer y entablar una amistad con Javi, un maestro de la sinceridad: gracias Zorrilla, me ayudaron muchísimo tus críticas constructivas.

Gracias Guchi por tus consejos, las lecciones de electrofisiología, las discusiones de estadística y por soportarme preguntándote a cada rato si conoces a tal o cual tipo en Europa. Gracias Jime, por tu ayuda con las curvas, los oocitos y por ser grossa. Gracias Maru por tu sonrisa contagiosa y tu capacidad irrefrenable de contagiar buen humor. Gracias Vivi por tu ayuda molecular y por levantar los días de mesada en el 15 con buena música. Gracias Pao por tus enseñanzas de los oocitos, por darme la oportunidad de colaborar en el proyecto de  $Ca^{2+}$ , las fructuosas discusiones, las quimeras y las mutantes del poro. Gracias Facu y Grace por ser excelentes compañeros. Gracias Ceci Calero por ayudarme en mi formación con los oocitos.

Les agradezco a Dani, Caro y Eleo, quienes junto con Belén y Marcela fueron un equipo excelente y muy agradable durante el trabajo con ascórbico. Fue una experiencia muy enriquecedora haber formado parte de ese equipo. Gracias Dani por los buenos consejos, las discusiones y por enseñarme a hacer cerveza. Gracias Caro por contagiar buena voluntad y por promover el orden en el lab. Gracias Eleo, por atender mis consultas de fisiología y técnicas y por las pastafrolas.

I am very thankful to Dr. Toby Collins, JasKiran Gill and Dr. Neil Millar from University College London, for their predisposition and collaboration in the binding site project. Gracias Jessi, por las mutantes de la doble cisteína.

Agradezco nuevamente a Marcela por su fructuosa participación en los tres proyectos que forman esta tesis.

Me alegro mucho de haber podido conocer y trabajar con Rachel y Dan en el proyecto de agonistas sintéticos. Fue una experiencia definitivamente memorable dentro y fuera del lab.

Gracias al Ranario y las criaturas que moran dentro por enseñarme a apreciar a los compañeros de trabajo y ser una motivación constante para el postdoc.

Afuera del labo también pasaron muchas cosas. Como olvidarme de los Groove Tippers, el cuarteto de jazz irregular que formamos con mis queridos compañeros Dan y Marcelo. Dos músicos excelentes, compañeros de trabajo invaluable y personas entrañables. O del infrecuente pero efectivo dúo Hambrela con Facu.

También estuvo la presunta neuroinmunobanda, fundada por el Dr. Calvo con miembros del complejo obligado y más allá. Hemos compartido grandes momentos musicales en una islita griega del barrio chino, hasta se dice por ahí que llegamos a sonar a The Police... Aunque Sebas esté so lonely.

Gracias Sebas y Naty, mis compañeros de ruta. Me acompañan desde la facu hasta el más allá. Mis amigos. Me hizo muy feliz tenerlos a un pasillo y una escalera de distancia.

Los trazadores, mi banda y refugio. Gracias Eze, Juanma y Marcelo.

Me acuerdo de tantas charlas, cenas, almuerzos, caminatas y partidos de ajedrez... Una indispensable y constante contención y ánimo de mis papás, que siempre están ahí para mí. Y por supuesto de los birrines con succulentas picadas después de un arduo día de experimentos con mi queridísima hermana, Walter y Blondie. También las cenas los viernes a la noche en flores con Hugo y Alicia, siempre conteniendonos.

Y mi compañera de vida. Mi mitad. Que vivió su experiencia a la par mía y le sobró comprensión y tolerancia para soportarme en mis peores momentos. Gracias Gre, si mejoré algo, fue por vos.



A Marcela Lipovsek.  
Por traerme al lab y formarme.

Parte de los resultados de esta tesis fueron publicados en:

J C Boffi, C Wedemeyer, M Lipovsek, E Katz, D J Calvo and A B Elgoyhen (2013). Positive modulation of the  $\alpha 9\alpha 10$  nicotinic cholinergic receptor by ascorbic acid. *British Journal of Pharmacology* (2013) 168 954–965.

## Índice.

<b>Abreviaturas</b> .....	<b>12</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>13</b>
1) Receptores nicotínicos de Acetilcolina (nAChRs) .....	<b>13</b>
1.1) La superfamilia de receptores Cys-loop .....	<b>14</b>
1.2) Características de los nAChRs .....	<b>14</b>
1.2.1) nAChRs Musculares .....	<b>14</b>
1.2.2) nAChRs Neuronales .....	<b>15</b>
1.2.3) nAChRs Epiteliales .....	<b>16</b>
1.3) Estructura de los nAChRs .....	<b>16</b>
1.3.1) Dominio Extracelular .....	<b>17</b>
1.3.1.1) Sitio de unión a ACh .....	<b>19</b>
1.3.2) Interfaz Extracelular-Transmembrana .....	<b>21</b>
1.3.3) Dominio Transmembrana .....	<b>22</b>
1.3.3.1) Canal .....	<b>22</b>
1.3.4) Dominio Intracelular .....	<b>23</b>
1.4) Funcionamiento de los nAChRs .....	<b>23</b>
1.5) Receptor Nicotínico $\alpha 9\alpha 10$ .....	<b>25</b>
1.5.1) Propiedades biofísicas .....	<b>25</b>
1.5.2) Farmacología .....	<b>26</b>
2) Rol Fisiológico del receptor nicotínico $\alpha 9\alpha 10$ .....	<b>28</b>
2.1) La Cóclea .....	<b>28</b>
2.2) Células Ciliadas del Órgano de Corti .....	<b>30</b>
2.3) Sinapsis Eferente Medial Olivo-Coclear .....	<b>32</b>
2.4) Pérdida de Audición por Trauma Acústico .....	<b>33</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>39</b>
<b>Métodos</b> .....	<b>40</b>
1) Obtención de receptores mutantes y quiméricos .....	<b>40</b>

1.1) Mutagénesis dirigida .....	40
1.2) Producción de subunidades quiméricas .....	42
2) Expresión de receptores nicotínicos recombinantes en oocitos de <i>X. laevis</i> .	46
2.1) Preparación de ARNc .....	46
2.2) Obtención de oocitos de <i>X. laevis</i> .....	46
2.3) Inyección de oocitos de <i>X. laevis</i> .....	47
3) Registros electrofisiológicos .....	48
3.1) Curvas concentración – respuesta .....	49
3.2) Curvas corriente – potencial .....	50
3.3) Evaluación de la modulación por $Ca^{2+}$ extracelular .....	50
4) Ensayos de unión a radioligando .....	51
5) Modelado de homología .....	52
6) Análisis estadístico .....	52
7) Drogas utilizadas .....	53

**Resultados .....** 55

**Capítulo 1 .....** 55

1) Caracterización de los componentes del sitio de unión a ligando del receptor $\alpha 9\alpha 10$ recombinante de rata .....	55
1.1) Contribución de las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ a los componentes principales de los sitios de unión a ACh .....	58
1.2) Contribución de las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ a los componentes complementarios de los sitios de unión a ACh .....	63
1.3) Discusión .....	73

**Capítulo 2 .....** 78

2) Determinantes moleculares de la dependencia del $Ca^{2+}$ extracelular del receptor nicotínico $\alpha 9\alpha 10$ recombinante de rata .....	78
2.1) Efecto del $Ca^{2+}$ extracelular sobre la $I_{m\acute{a}x}$ del receptor $\alpha 9\alpha 10$ recombinante de rata .....	80
2.2) Rol de los residuos E175 de $\alpha 9$ y $\alpha 10$ en la modulación por $Ca^{2+}$ .....	83
2.3) Rol de las regiones extracelulares de la subunidad $\alpha 10$ en la modulación por $Ca^{2+}$ .....	87

2.4) Residuos candidatos involucrados en la potenciación por $\text{Ca}^{2+}$ extracelular .....	93
2.5) Efecto de la sustitución R129V en el Cys-loop sobre la potenciación por $\text{Ca}^{2+}$ .....	94
2.6) Efecto de la sustitución N173D en el loop $\beta 8$ - $\beta 9$ , A211S en el tramo N-terminal de TM1 ó S270N en el loop TM2-TM3 sobre la potenciación por $\text{Ca}^{2+}$ .....	97
2.7) Discusión .....	100
<b>Capítulo 3</b> .....	<b>104</b>
3) Modulación positiva del receptor nicotínico $\alpha 9\alpha 10$ recombinante de rata por ácido ascórbico .....	104
3.1) Efecto del ASC sobre las respuestas a ACh en receptores $\alpha 9\alpha 10$ recombinantes .....	105
3.2) Efecto de agentes redox sobre las respuestas a ACh en receptores $\alpha 9\alpha 10$ recombinantes .....	112
3.3) Contribución de residuos arginina extracelulares al mecanismo de potenciación por ASC .....	116
3.4) Una sustitución puntual en el poro del receptor $\alpha 9\alpha 10$ que produce su apertura espontánea convierte al ASC en un agonista parcial .....	119
3.5) Efecto del ASC sobre las respuestas a ACh en receptores $\alpha 7$ ó $\alpha 4\beta 2$ recombinantes .....	121
3.6) Discusión .....	122
<b>Conclusiones</b> .....	<b>126</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>127</b>

## Abreviaturas.

5HT<sub>3</sub>: Receptores de serotonina tipo 3.  
ACh: Acetilcolina.  
AChBP: Proteína de unión a acetilcolina.  
ADN: Ácido desoxirribonucleico.  
ADNc: ADN copia.  
Ala, A: Alanina.  
Arg, R: Arginina.  
ARN: Ácido ribonucleico.  
ARNc: ARN copia.  
ASC: L-ácido ascórbico, Vitamina C.  
Asn, N: Asparagina.  
Asp, D: Ácido aspártico.  
CCE, CCI: Células ciliadas externas e internas respectivamente.  
Cys: Cisteína.  
DHA: Dehidroascorbato.  
D-iso-ASC: Ácido D-iso-ascórbico.  
DTT: Ditiotreitól.  
DTNB: Ácido (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzónico)), reactivo de Ellman.  
EC<sub>50</sub>: Concentración efectiva 50.  
Fw: Primer sentido.  
GABA: Ácido  $\gamma$ -aminobutírico.  
I<sub>20</sub>: Amplitud de corriente a los 20 seg de alcanzada la amplitud máxima de una respuesta.  
I<sub>máx</sub>: Amplitud de respuesta máxima.  
I-V: Curvas de corriente en función de potencial.  
LGIC: Canales iónicos activados por ligando.  
M, mM,  $\mu$ M: Molar, Milimolar y Micromolar respectivamente.  
MLA: Metillicaconitina.  
nA: Nano amperios.  
nAChR: Receptor nicotínico de acetilcolina.  
NMDA: N-metil-D-aspartato.  
PAM: Modulador alostérico positivo.  
PTS: Permanent threshold shift, corrimiento permanente en el umbral de percepción de sonido.  
Rv: Primer antisentido.  
Ser, S: Serina.  
S.E.M.: Error estandar de la media.  
SNC: Sistema nervioso central.  
Thr, T: Treonina.  
Trp, W: Triptófano.  
TM1, 2, 3, 4: Tramo transmembrana 1 a 4 respectivamente.  
TTS: Temporary threshold shift, corrimiento temporario en el umbral de percepción de sonido.  
V, mV: Volt o Voltaje y Milivolt respectivamente.  
Val, V: Valina.  
WT: Wild type, Salvaje.

## Introducción.

### 1) Receptores Nicotínicos de Acetilcolina.

En 1907 John Newport Langley publicó sus experimentos con sustancias que producían contracción muscular, donde nombra a la “Sustancia Receptiva a Nicotina” de la unión neuromuscular (Langley, 1907). Éste fue el primer receptor para un neurotransmisor en ser reconocido y nombrado. En 1913 Henry Hallett Dale y Arthur Ewins descubren la presencia de acetilcolina (ACh) en muestras biológicas y más tarde junto a Otto Loewi confirman su función como neurotransmisor (Ewins, 1914; Tansey, 1991; Tansey, 2006). Treinta y dos años después, gracias a estos descubrimientos les otorgaron el premio Nobel de Medicina y Fisiología. Así la ACh se convirtió en el primer neurotransmisor en ser identificado. Durante los años subsiguientes al descubrimiento, Dale demostró que la ACh es responsable de la transmisión neuromuscular. Hacia finales de la década del 50 Bernard Katz comenzó la caracterización electrofisiológica de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) en la sinapsis neuromuscular (Katz and Thesleff, 1957). De esta forma, los nAChRs se convirtieron en los primeros receptores de neurotransmisor en ser estudiados electrofisiológicamente. Posteriormente, gracias al desarrollo de los registros electrofisiológicos de canal único por patch clamp, Neher y Sackman emplearon nAChRs de la sinapsis neuromuscular para estudiar, por primera vez, el comportamiento de un receptor a nivel de molécula única (Neher and Sakmann, 1976).

La purificación del nAChR del órgano eléctrico de la raya *Torpedo marmorata* en la década de 1970 (Cohen *et al.*, 1972; Hartman and Heilbronn, 1978; Sobel and Changeux, 1977; Sobel *et al.*, 1977) y el clonado de sus subunidades a mediados de la década de 1980 (Ballivet *et al.*, 1982; Marx, 1983; Noda *et al.*, 1982; Noda *et al.*, 1983a; Noda *et al.*, 1983b; Patrick *et al.*, 1983) permitió realizar la primera caracterización molecular y funcional de un receptor. Hacia finales del siglo XX, se obtuvieron imágenes por microscopía electrónica de la estructura molecular del nAChR del órgano eléctrico de *Torpedo marmorata* (Miyazawa *et al.*, 1999; Tierney and Unwin, 2000; Unwin, 1993; Unwin, 2005; Unwin, 2003).

Gracias a estos esfuerzos hoy contamos con un vasto conocimiento acerca de los nAChRs. Algunos ejemplos son su familia de proteínas, la relación estructura-función, su rol fisiológico y farmacología; que se desarrollarán en las secciones siguientes.

### 1.1) La superfamilia de receptores Cys-loop.

Los nAChRs son miembros de la superfamilia de receptores Cys-loop, la cual está conformada por canales iónicos activados por ligando (LGICs) pentaméricos. En estos pentámeros las subunidades se disponen alrededor de un poro central que conforma el canal iónico. Los miembros de esta superfamilia se caracterizan por tener un tramo muy conservado de 13 aminoácidos, flanqueados por dos cisteínas que forman un puente disulfuro, disponiendo esos residuos en un loop (Cys-loop). La familia de receptores Cys-loop comprende a los receptores ionotrópicos de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA<sub>A</sub>), los receptores de serotonina tipo 3 (5-HT<sub>3</sub>), los receptores de glicina, receptores de glutamato e histidina de invertebrados, receptores sensibles a pH y GABA de procariotas y los nAChRs (Karlin, 2002; Lester *et al.*, 2004; Pan *et al.*, 2012; Spurny *et al.*, 2012).

### 1.2) Características de los nAChRs.

Existen 17 subunidades proteicas que conforman los nAChRs pentaméricos en vertebrados:  $\alpha$ 1-10,  $\beta$ 1-4,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  (Karlin, 2002; Millar and Gotti, 2009). Por convención, las subunidades  $\alpha$  se caracterizan por tener un par de cisteínas contiguas que forman un puente disulfuro en uno de los loops que conforman el sitio de unión a ACh (C192-C193 en la subunidad  $\alpha$ 1 de *T. marmorata*).

Estas subunidades conforman pentámeros en combinaciones específicas, lo que provee a los distintos nAChRs de sus propiedades particulares. En base a estas propiedades y a sus patrones de expresión definidos, los nAChRs se diferencian en tres grupos: musculares, neuronales y epiteliales.

#### 1.2.1) nAChRs musculares.

Los nAChRs musculares se encuentran en las uniones neuromusculares de los vertebrados y en los órganos eléctricos de algunos peces. Están conformados por las subunidades  $\alpha$ 1,  $\beta$ 1,  $\delta$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$ , las cuales se agrupan en dos combinaciones diferentes con propiedades biofísicas específicas. Particularmente, la estequiometría ( $\alpha$ 1)<sub>2</sub> $\beta$ 1 $\delta$  $\epsilon$  es característica de las uniones neuromusculares en individuos adultos. En cambio, el



músculo embrionario presenta una estequiometría  $(\alpha 1)_2\beta 1\delta\gamma$ . Esta composición diferente de subunidades causa que los receptores adultos tengan una conductancia de canal único mayor, un menor tiempo de apertura y una mayor permeabilidad para el ión  $\text{Ca}^{2+}$  que los receptores embrionarios (Kalamida *et al.*, 2007; Millar and Gotti, 2009).

### 1.2.2) nAChRs Neuronales.

Los nAChRs neuronales por convención están compuestos por subunidades  $\alpha 2$ - $\alpha 8$  y  $\beta 2$ - $\beta 4$ , aunque estas subunidades no solo se expresan y ejercen una función en células neuronales (Albuquerque *et al.*, 2009). Se los agrupa en dos clases: de alta afinidad a agonista e insensibles a  $\alpha$ -bungarotoxina y los de baja afinidad a agonista y sensibles a  $\alpha$ -bungarotoxina. Los receptores neuronales de baja afinidad y sensibles a  $\alpha$ -bungarotoxina se conforman por subunidades  $\alpha 7$  ó  $\alpha 8$  y tienen la particularidad de poder formar receptores homoméricos (Albuquerque *et al.*, 2009). Los receptores neuronales de alta afinidad e insensibles a  $\alpha$ -bungarotoxina son heteroméricos. Están compuestos por subunidades  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  ó  $\alpha 6$  las cuales necesitan co-ensamblarse con subunidades  $\beta 2$  o  $\beta 4$  para formar receptores funcionales (Boorman *et al.*, 2000; Cooper *et al.*, 1991). Además, las subunidades  $\alpha 5$  y  $\beta 3$  solo pueden incorporarse a receptores que ya posean otras subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  neuronales (Boorman *et al.*, 2000; Ramirez-Latorre *et al.*, 1996). La subunidad  $\alpha 8$  se encuentra en todos los vertebrados excepto en los mamíferos (Jones *et al.*, 2003; Schoepfer *et al.*, 1988).

En cuanto a su distribución, los receptores  $\alpha 7$  homomérico y  $\alpha 4\beta 2$  son los más abundantes en el sistema nervioso. Los receptores  $\alpha 3\beta 4$  están presentes en ganglios autonómicos, la médula adrenal, la habénula media, núcleo interpeduncular, médula dorsal, glándula pineal y retina. El resto de los receptores neuronales tienen un patrón de expresión mucho más restringido (Millar and Gotti, 2009).

Un mismo tipo celular puede expresar más de un tipo de receptor neuronal y en diferentes localizaciones (somática, presináptica, postsináptica o axonal), lo que les atribuye diferentes roles. Por ejemplo, los receptores presinápticos facilitan la liberación de neurotransmisor en sinapsis colinérgicas, dopaminérgicas, noradrenérgicas, glutamatérgicas, serotoninérgicas y gabaérgicas. Los receptores postsinápticos, en cambio, median una proporción muy pequeña de la neurotransmisión excitatoria rápida en el sistema nervioso central (SNC). En el cerebro, la inervación colinérgica es difusa pero abundante, lo que sugiere un rol modulador de la excitabilidad neuronal (Dani,

2001; Lucas-Meunier *et al.*, 2003). Además, los receptores neuronales están implicados en procesos cognitivos de aprendizaje y memoria, en mecanismos de adicción y en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo (Kalamida *et al.*, 2007).

Como ya mencionamos, los receptores neuronales no solo se expresan y ejercen una función en el sistema nervioso. Un ejemplo de esto es la expresión de subunidades neuronales en células del sistema inmune. Particularmente, la subunidad  $\alpha 7$  se expresa en linfocitos donde cumpliría un rol inmunomodulatorio, conocido como la “via colinérgica anti-inflamatoria” (Kalamida *et al.*, 2007; Millar and Gotti, 2009).

### 1.2.3) nAChRs Epiteliales.

La subunidad  $\alpha 9$  se expresa en las células ciliadas de la cóclea, la *pars tuberalis* de la glándula hipófisis, el epitelio nasal, la lengua, ganglios de la raíz dorsal, médula ósea y células sanguíneas (Elgoyhen *et al.*, 1994; Elgoyhen *et al.*, 2001; Millar and Gotti, 2009; Vincler *et al.*, 2006). En las células ciliadas de la cóclea,  $\alpha 9$  se co-expresa con la subunidad  $\alpha 10$  y ambas se co-ensamblan en un receptor heteromérico que participa del control eferente de la audición (Elgoyhen *et al.*, 2001; Katz *et al.*, 2004; Vetter *et al.*, 2007). Además de esto, los receptores  $\alpha 9\alpha 10$  se expresan en ganglios de la raíz dorsal donde cumplirían un rol en la transducción del dolor neuropático y en la patofisiología de un nervio dañado (Vincler *et al.*, 2006). Sin embargo, no se ha detectado la expresión de estas subunidades en el cerebro (Elgoyhen *et al.*, 1994; Elgoyhen *et al.*, 2001).

Si bien la subunidad  $\alpha 9$  es capaz de formar receptores homoméricos funcionales (Elgoyhen *et al.*, 1994), forma receptores heteroméricos con mayor eficiencia al co-expresarse con la subunidad  $\alpha 10$ . En cambio, la subunidad  $\alpha 10$  en mamíferos no forma canales homoméricos y solo forma receptores funcionales al co-expresarse con la subunidad  $\alpha 9$  (Elgoyhen *et al.*, 2001; Sgard *et al.*, 2002).

### 1.3) Estructura de los nAChRs.

La estructura de los nAChRs de vertebrados no ha podido ser estudiada por difracción de rayos X debido a la dificultad de obtener cristales. Sin embargo, se ha cristalografiado una variedad de proteínas de procariotas de la familia Cys-loop, proteínas de invertebrados con un buen porcentaje de identidad de secuencia con

receptores Cys-loop, un fragmento de la subunidad nicotínica  $\alpha 1$  de ratón y quimeras de subunidades nicotínicas con otras proteínas. Estas alternativas, sumadas a otras estrategias como el método de accesibilidad a cisteínas modificadas (SCAM) y el marcado de afinidad han permitido el estudio de la estructura de los nAChRs.

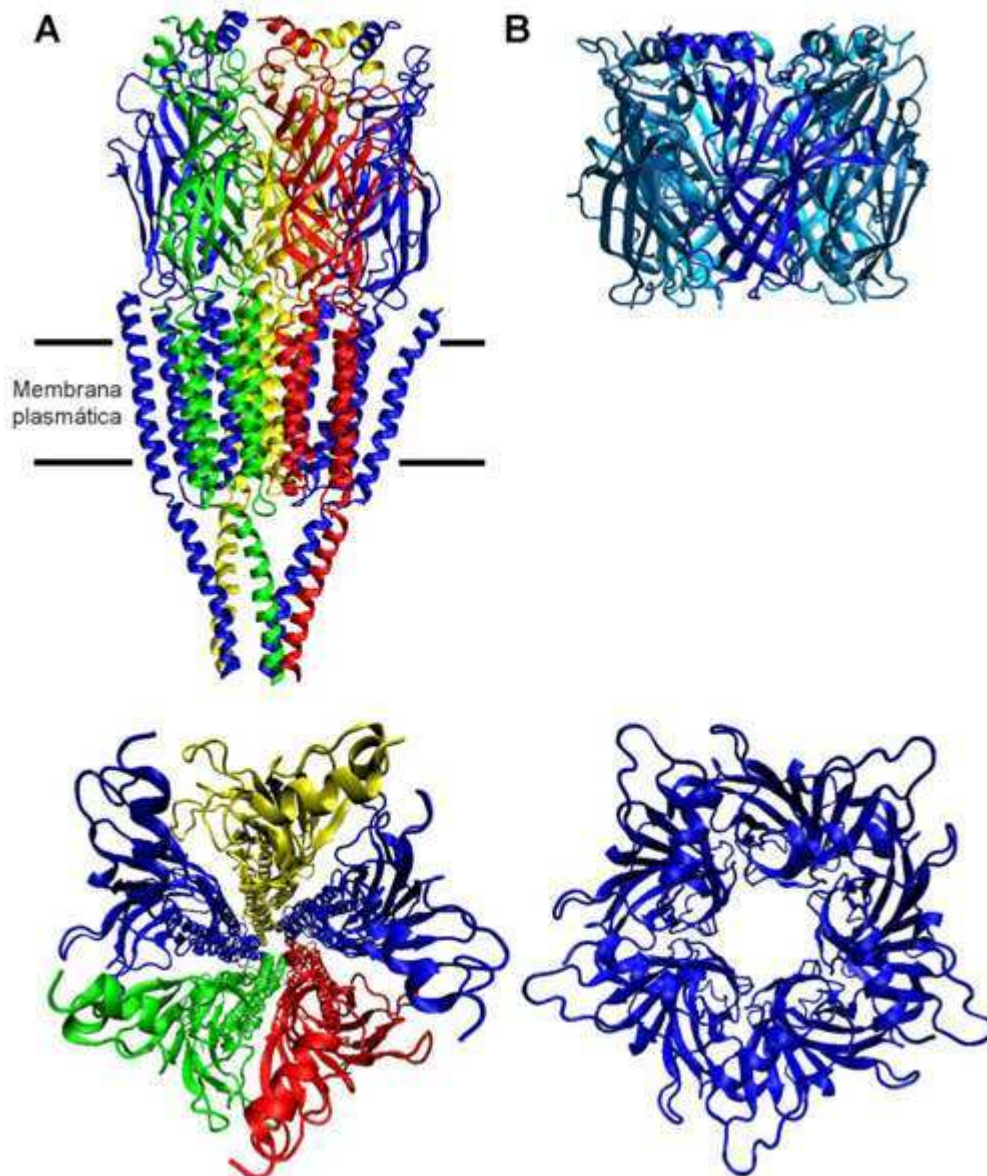
La estructura general del nAChR del órgano eléctrico de *T. marmorata* pudo ser determinada por microscopía electrónica de cristales tubulares con una resolución de 4Å (Miyazawa *et al.*, 1999; Unwin, 2005) (Fig. 1A). En esa estructura se aprecia un largo total del receptor de 160Å, un dominio extracelular con el sitio de unión a ACh y un “vestíbulo” que conduce al poro del canal de 20Å de diámetro y 60Å de largo, una región transmembrana de 40Å de largo que contiene el poro del canal y una porción intracelular pequeña. En los últimos años, se lograron obtener cristalografías de receptores Cys-loop procariotas de *Erwinia chrysanthemi* (ELIC) y de *Gleobacter violaceus* (GLIC), lo cual representa un gran avance en el conocimiento de las estructuras de la familia de proteínas de los nAChRs (Bocquet *et al.*, 2009; Hilf and Dutzler, 2009; Hilf and Dutzler, 2008).

### 1.3.1) Dominio Extracelular.

La mayor parte del conocimiento estructural que tenemos del dominio extracelular de los nAChRs y de todos los receptores Cys-loop se lo debemos a la cristalografía de la proteína de unión a ACh (AChBP) de las células gliales del molusco *Lymnea stagnalis* (Brejc *et al.*, 2001). Esta estructura permitió confirmar los datos obtenidos previamente por SCAM, marcado de afinidad y mutagénesis dirigida. En el caracol *L. stagnalis*, esta proteína soluble tiene un rol modulador de la transmisión sináptica, al ser secretada por las células gliales de manera dependiente de ACh (Smit *et al.*, 2001).

La estructura de la AChBP consta de cinco subunidades idénticas de 210 aminoácidos dispuestas alrededor de un espacio central (Fig. 1B). Su secuencia aminoacídica tiene un 20-24% de homología con la región N-terminal (extracelular) de los nAChRs, estando más emparentada con los dominios extracelulares de las subunidades  $\alpha$  (Karlin, 2002). La subunidad que conforma la AChBP presenta el par de cisteínas característico de los receptores Cys-loop, solo que forman un loop de 12 residuos en lugar de 13. Además, presentan el par de cisteínas contiguas característico de las subunidades  $\alpha$  nicotínicas. También se obtuvieron cristales de AChBPs de otras

especies con resoluciones de hasta 1,67Å y co-cristalizadas con agonistas y antagonistas nicotínicos (Zouridakis *et al.*, 2009). Finalmente, en el año 2007 se obtuvo una cristalografía de 1.94Å de resolución del dominio extracelular de una subunidad  $\alpha$ 1 de ratón unida a  $\alpha$ -bungarotoxina (Dellisanti *et al.*, 2007).



**Figura 1:** A) Estructura molecular del receptor nicotínico del órgano eléctrico de Torpedo, evaluada por microscopía electrónica (4Å de resolución, 2BG9.pdb). Las subunidades  $\alpha$  están coloreadas en azul, la subunidad  $\beta$  en rojo, la  $\gamma$  en verde y la  $\delta$  en amarillo. Panel superior: vista lateral. Panel inferior: vista desde extracelular hacia intracelular. B) Estructura cristalográfica de la AChBP de *Lymnea stagnalis* (2,7Å de resolución, 1I9B.pdb). Al ser homomérica, la única subunidad que la conforma está coloreada en azul. Panel superior: vista lateral. Panel inferior: vista de N terminal a C terminal.

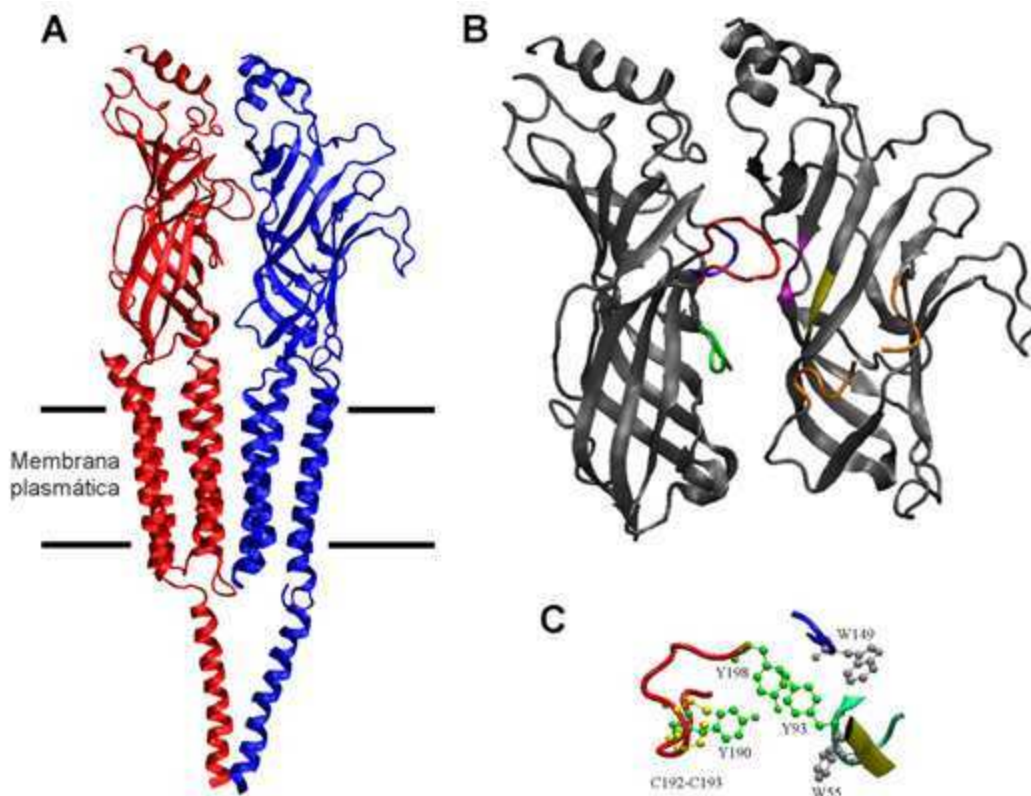
El dominio extracelular del nAChR de *T. marmorata* tiene una conformación tridimensional prácticamente idéntica a la de la AChBP (Fig. 1A, B). Cada subunidad de la AChBP y cada dominio extracelular del nAChR están organizados alrededor de un  $\beta$ -sándwich “enrollado”, de 10 tramos  $\beta$  y con un centro hidrofóbico. Además, presentan una  $\alpha$ -hélice N-terminal y dos hélices  $3_{10}$  cortas (Brejc *et al.*, 2001; Unwin, 2005). El interior del vestíbulo extracelular que precede al poro del canal presenta numerosos residuos con carga negativa, por lo que se propone que el vestíbulo es selectivamente permeable a cationes (Unwin, 2005).

#### 1.3.1.1) Sitios de unión a ACh

Los sitios de unión a ACh se encuentran en las interfaces entre los dominios extracelulares de subunidades adyacentes (Fig. 2A, B) a 50Å por encima de la membrana (Unwin, 2005). Por lo tanto, un receptor puede tener hasta cinco sitios de unión a ACh (Raves *et al.*, 2009). Las superficies de los dominios extracelulares que conforman un sitio de unión exponen diferentes componentes estructurales y residuos, por lo que no son equivalentes (Karlin, 2002). Estas superficies no equivalentes son los componentes del sitio de unión a ACh. Por convención, una subunidad aporta el componente principal con residuos muy conservados y la adyacente aporta el componente complementario menos conservado. Solo las subunidades de tipo  $\alpha$  aportan componentes principales a sitios de unión y los componentes complementarios en cambio pueden ser aportados por algunas subunidades  $\alpha$ , y por las subunidades  $\beta$  (excepto  $\beta_1$ ),  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  (Corringer *et al.*, 2000). Al combinarse diferentes componentes provistos por distintas subunidades, los sitios de unión a ACh presentes en los distintos tipos de nAChRs adquieren afinidades por ACh y propiedades farmacológicas y funcionales características (Blount and Merlie, 1989; Prince and Sine, 1999). Además, ya que no todas las combinaciones que se dan en un pentámero son funcionales, los distintos nAChRs pueden tener diferentes números de sitios de unión a ACh, los cuales pueden ser o no equivalentes (Carbone *et al.*, 2009; Mazzaferro *et al.*, 2011). Por ejemplo, el receptor muscular adulto tiene solo dos sitios de unión a ACh no equivalentes, compuestos por interfaces  $\alpha_1/\delta$  y  $\alpha_1/\epsilon$  (Martinez *et al.*, 2000). El receptor neuronal  $\alpha_7$  homomérico en cambio presenta 5 sitios de unión equivalentes  $\alpha_7/\alpha_7$  (Raves *et al.*, 2009).

El componente principal de un sitio de unión a ACh está compuesto por tres loops que exponen residuos característicos y muy conservados entre las subunidades nicotínicas  $\alpha$ : los loops A, B y C (Fig. 2A, B). El componente complementario está compuesto predominantemente por tramos  $\beta$ , pero históricamente se los denominó loops (previo a la obtención de estructuras): los loops D, E, y F (Karlín, 2002).

Un sitio de unión consiste en un bolsillo de residuos en su mayoría aromáticos (Karlín, 2002). Los residuos conservados que lo componen se resumen en la figura 2C. Los orbitales  $\pi$  de estos residuos aromáticos estabilizarían la carga positiva del amonio cuaternario de la ACh, a través de interacciones catión- $\pi$ . Este tipo de interacción se ha demostrado experimentalmente para el Trp149 (numeración de la subunidad  $\alpha 1$  de *T. marmorata*), altamente conservado (Zhong *et al.*, 1998).

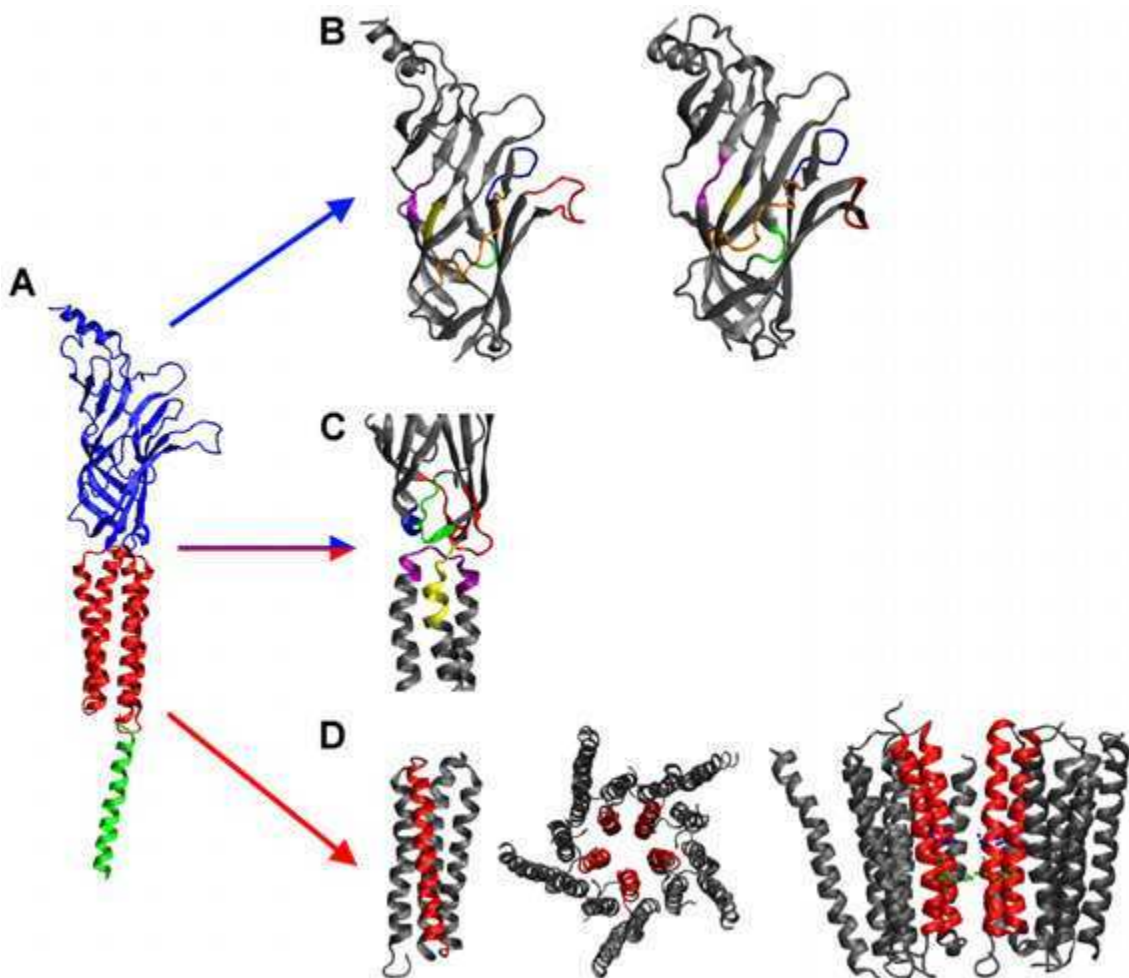


**Figura 2:** A) Estructura de una subunidad  $\alpha$  y una  $\delta$  adyacentes en un receptor nicotínico de Torpedo. B) Estructura de la interfaz entre los dominios extracelulares de estas subunidades adyacentes. El componente principal del sitio de unión a ACh aportado por la subunidad  $\alpha$  está remarcado en verde (loop A), azul (loop B) y rojo (loop C). El componente complementario aportado por la subunidad  $\delta$  se resalta en amarillo (loop D), violeta (loop E) y naranja (loop F). C) Orientación espacial de los residuos conservados del sitio de unión a ACh en la interfaz de unión  $\alpha\delta$ . Los loops están coloreados según B).



### 1.3.2) Interfaz Extracelular-Transmembrana

El sitio de unión a ACh se encuentra a 50Å de la región transmembrana (Fig. 3A, B) que actúa como compuerta para el flujo de iones a través de la membrana (Unwin, 2005). Por lo tanto, la comunicación entre estas dos regiones es esencial para el funcionamiento de los receptores (Bartos *et al.*, 2009). La interfaz extracelular-transmembrana es la zona de transición estructural donde las hojas  $\beta$  extracelulares se comunican con las  $\alpha$  hélices transmembrana. Las estructuras que la componen son el loop  $\beta$ 1- $\beta$ 2, el loop  $\beta$ 8- $\beta$ 9, el Cys-loop, el extremo extracelular N-terminal del primer paso transmembrana (TM1) y el loop entre los pasos transmembrana 2 y 3 (loop TM2-TM3) (Fig. 3 A, C). Esta red de estructuras mediaría el proceso bidireccional alostérico de acople funcional entre el sitio de unión a ligando y el poro (Bartos *et al.*, 2009; Bouzat, 2012; Bouzat *et al.*, 2008).



**Figura 3:** A) Estructura de una subunidad  $\alpha 1$  nicotínica de Torpedo. El dominio extracelular se remarca en azul, el transmembrana en rojo y la  $\alpha$  hélice MA intracelular en verde. B) Panel izquierdo: estructura del dominio extracelular de la subunidad  $\alpha$  de Torpedo. Panel derecho: estructura de una subunidad de la AChBP de Lymnea. En ambos casos los componentes del sitio de unión a ACh se encuentran resaltados de acuerdo a la figura 2B. C) Estructura de la interfaz extracelular-transmembrana de la subunidad  $\alpha$  de Torpedo. El loop  $\beta 1$ - $\beta 2$  está coloreado en azul, el Cys-loop en rojo, el loop  $\beta 8$ - $\beta 9$  en verde, el tramo N-terminal de TM1 en amarillo y el loop TM2-TM3 en violeta. Por claridad, se omitió el paso transmembrana 4 (TM4) en esta estructura. D) Panel izquierdo: Estructura del dominio transmembrana de la subunidad  $\alpha$  de Torpedo. El paso transmembrana 2 (TM2) está resaltado en rojo. Panel central: Estructura del poro conformado por los dominios transmembrana de las subunidades del receptor nicotínico de Torpedo. Los tramos TM2 están resaltados en rojo. Vista desde extracelular hacia intracelular. Panel derecho: estructura del poro conformado por los dominios transmembrana del receptor nicotínico de Torpedo, en vista lateral. Se removió la subunidad  $\gamma$  para exponer el interior del poro. Los tramos TM2 están resaltados en rojo y los residuos L9' y V13' están remarcados en verde y azul respectivamente.

### 1.3.3) Dominio Transmembrana.

El dominio transmembrana de las subunidades nicotínicas consiste en 4  $\alpha$ -hélices que la atraviesan (TM1-4) (Unwin, 2005). En el pentámero, los dominios transmembrana conforman un anillo interno, que interactúa con los iones permeantes y constituye el poro central, y un “escudo” que aísla el poro del entorno lipídico de la membrana (Miyazawa *et al.*, 1999). El anillo interno está conformado por los tramos TM2 de las cinco subunidades, los cuales tapizan el poro del canal, y el “escudo” por los tramos TM1, TM3 y TM4 de cada subunidad (Fig. 3D) que aíslan los tramos TM2 de los lípidos de membrana (Miyazawa *et al.*, 1999). Los tramos TM2 están inclinados generando una forma de embudo (Fig. 3D) ensanchándose en dirección hacia extracelular. Cerca de la superficie extracelular de la membrana, los tramos TM2 se separan entre sí por su inclinación, dejando que los dominios TM1 también participen del tapizado del poro en esa región (Unwin, 2005).

#### 1.3.3.1) Canal.

Los cinco tramos TM2 exponen residuos muy conservados en dirección del eje del canal y en posiciones determinadas, formando anillos de entornos químicos particulares a través del poro. En su mayoría, esos anillos son hidrofóbicos y en



particular los formados por la Leu9' o Val13' (Fig. 3D), siguiendo la numeración de TM2 según (Miller, 1989), generan la menor apertura a través del canal (6 Å de diámetro) (Miyazawa *et al.*, 1999; Unwin, 2005). Este espacio sería muy estrecho para permitir el paso de iones sodio o potasio hidratados, ya que en un entorno no polar no podrían perder su capa de hidratación fácilmente. Esta región es la que actuaría como compuerta del canal, no ocluyendo el poro, sino funcionando como una barrera energética que desfavorecería el pasaje de iones (Miyazawa *et al.*, 1999; Unwin, 2005). Esta hipótesis ha sido respaldada con experimentos de mutagénesis dirigida (Labarca *et al.*, 1995; Plazas *et al.*, 2005a; Revah *et al.*, 1991).

Existen tres anillos de residuos cargados en los extremos del poro en posición 20', -1' y -4'. Estos tres anillos son aniónicos y son determinantes de la conductancia de cationes monovalentes e interactúan con divalentes (Imoto *et al.*, 1988).

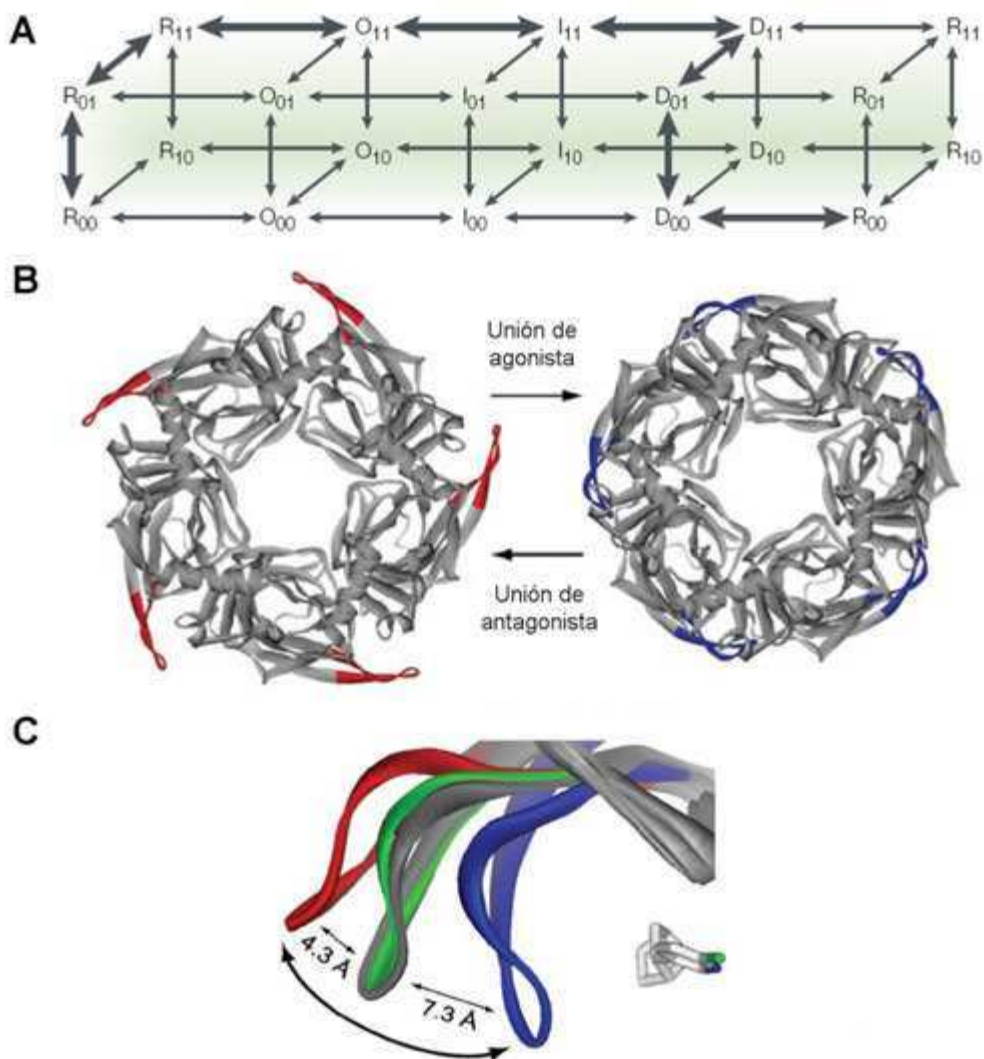
#### 1.3.4) Dominio Intracelular.

El dominio intracelular de las subunidades nicotínicas está conformado por el loop TM3-TM4. Es una región con una gran variabilidad entre los distintos tipos de subunidades, cuya longitud oscila entre 110 y 270 aminoácidos (Karlin, 2002). La estructura de este loop parece ser muy desordenada ya que no pudo resolverse por microscopía electrónica (Unwin, 2005). Lo único que conocemos de su estructura es que cerca de TM4 forma una  $\alpha$ -hélice (denominada MA, Fig. 3A) y que en el pentámero esas cinco  $\alpha$ -hélices conforman un vestíbulo intracelular de 20Å de diámetro (Unwin, 2005). Los dominios MA también están inclinados en forma de embudo y forman cinco ventanas laterales de 8Å (aproximadamente el diámetro de un ión sodio o potasio hidratado) hacia donde exponen residuos de carga negativa, lo cual constituiría la salida obligatoria para los iones desde el canal (Unwin, 2005). La parte desorganizada y muy variable del loop intracelular podría estar involucrada en diversas funciones de los receptores, ya que su fosforilación afecta su desensibilización, expresión en membrana e interacciones con el citoesqueleto (Zouridakis *et al.*, 2009).

#### 1.4) Funcionamiento de los nAChRs.

La estructura oligomérica, con múltiples sitios de unión a agonista interactuando a distancia con el canal mediante cambios cooperativos en la estructura terciaria, sugiere

una naturaleza alostérica para el funcionamiento de los nAChRs (Colquhoun, 1998; Lena and Changeux, 1993). Esto plantea que los receptores pueden encontrarse en un equilibrio de diversos estados y que este equilibrio es afectado por la unión de agonistas o antagonistas (Colquhoun, 1998). Se ha propuesto un modelo de Monod-Wyman-Changeaux con múltiples estados para el funcionamiento de los nAChRs (Lena and Changeux, 1993). Este modelo describe cuatro estados para los receptores: un estado de reposo no conductor, un estado activado conductor y dos estados de alta afinidad por el agonista pero no conductores llamados desensibilizados rápido y lento (Fig. 4A) (Karlin, 2002; Lena and Changeux, 1993).



**Figura 4:** A) Modelo de cuatro estados para el funcionamiento del receptor nicotínico muscular (con dos sitios de unión a ACh). Los estados del receptor son: reposo (R), abierto (O), desensibilizado rápido (I) y desensibilizado lento (D). En este modelo se asume que los sitios de unión a ACh no son equivalentes.

Los subíndices indican sus tres estados de ocupación: vacíos (00), solo uno ocupado (01 ó 10) y ambos ocupados (11). Las flechas gruesas indican el mecanismo principal de la reacción. Adaptado de (Karlín, 2002). B) Estructuras cristalográficas de las conformaciones adoptadas por la AChBP de *Aplysia* al unir conotoxina ImI (antagonista nicotínico, panel izquierdo) o epibatidina (agonista nicotínico, panel derecho). Las conformaciones del loop C se resaltan en rojo y azul respectivamente. C) Superposición de las conformaciones que adopta el loop C en las cristalografías de la AChBP de *Aplysia* unida a conotoxina ImI (rojo), metillicaconitina (antagonista nicotínico, verde) o epibatidina (azul). B) y C) adaptado de (Hansen *et al.*, 2005).

Los cambios conformacionales responsables de las transiciones alostéricas mencionadas aún no han sido completamente elucidados. Sin embargo, el análisis estructural de las cristalografías de AChBPs en presencia de agonistas y antagonistas permitió explorar los posibles cambios conformacionales que ocurrirían en el dominio extracelular en respuesta a la unión de ACh (Celie *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2005). Particularmente, el cambio más pronunciado ocurriría en el loop C del sitio de unión a ACh, el cual se movería  $\sim 11\text{\AA}$  “cerrándose” sobre la ACh (Fig. 4 B, C) (Zouridakis *et al.*, 2009). Cabe destacar que el loop C está ubicado entre los tramos  $\beta 9$  y  $\beta 10$ , y que el tramo  $\beta 10$  está directamente vinculado al dominio transmembrana a través de TM1 (Unwin, 2005).

### 1.5) Receptor Nicotínico $\alpha 9\alpha 10$ .

Las subunidades nicotínicas  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  son integrantes de la subfamilia de subunidades epiteliales. La subunidad  $\alpha 9$  forma un receptor homopentamérico funcional al ser expresada en oocitos de *Xenopus laevis* (Elgoyhen *et al.*, 1994). En cambio no se detecta la expresión de receptores funcionales conformados por la subunidad  $\alpha 10$  de rata o humano en distintos sistemas de expresión (Elgoyhen *et al.*, 2001; Sgard *et al.*, 2002). Al co-expresar ambas subunidades en oocitos de *X. laevis* se detectan receptores funcionales cuyas respuestas a ACh son 100 a 1000 veces mayores que las obtenidas cuando se expresa el receptor homomérico  $\alpha 9$  (Elgoyhen *et al.*, 2001). El receptor  $\alpha 9\alpha 10$  presenta una estequiometría de  $(\alpha 9)_2(\alpha 10)_3$  al ser expresado en oocitos de *X. laevis* (Plazas *et al.*, 2005b).

#### 1.5.1) Propiedades biofísicas.

A diferencia del receptor homomérico  $\alpha 9$ , las respuestas evocadas por  $\alpha 9\alpha 10$  disminuyen en el tiempo ante una aplicación prolongada de ACh, es decir que presentan desensibilización (Elgoyhen *et al.*, 2001), la cual depende de la concentración de agonista, del tiempo de aplicación y del tipo de receptor (Quick and Lester, 2002). Sin embargo, la desensibilización de  $\alpha 9\alpha 10$  no es tan rápida como la de los receptores homoméricos  $\alpha 7$  (Seguela *et al.*, 1993). La relación de corriente en función de voltaje (curva I-V) de  $\alpha 9\alpha 10$  presenta una marcada rectificación saliente, en contraste a las del resto de los nAChRs, las cuales presentan rectificación entrante (Bertrand *et al.*, 1990; Ifune and Steinbach, 1991; Sands and Barish, 1992; Seguela *et al.*, 1993) con la excepción de los receptores musculares y del órgano eléctrico de Torpedo (Cens *et al.*, 1997; Ragozzino *et al.*, 1998). El receptor  $\alpha 9\alpha 10$  presenta una alta permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  (Weisstaub *et al.*, 2002), comparable a la de los receptores  $\alpha 7$  (Seguela *et al.*, 1993). El  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular también modula las respuestas de  $\alpha 9\alpha 10$  de manera bifásica: concentraciones crecientes las potencian en el rango sub-milimolar y las bloquean por permeación de manera voltaje-dependiente (Elgoyhen *et al.*, 2001; Weisstaub *et al.*, 2002).

### 1.5.2) Farmacología.

El receptor  $\alpha 9\alpha 10$  es un miembro muy peculiar de la familia de los nAChRs, ya que presenta un perfil farmacológico que no se ajusta a la clasificación muscarínica ni nicotínica de los receptores colinérgicos (Elgoyhen *et al.*, 2001). Curiosamente, el agonista clásico nicotina se comporta como un antagonista de este receptor, al igual que la muscarina (Elgoyhen *et al.*, 2001). Más aún,  $\alpha 9\alpha 10$  presenta propiedades farmacológicas de otros miembros de la familia Cys-loop, como los receptores de glicina,  $\text{GABA}_A$  y  $5\text{HT}_{3A}$  (Elgoyhen *et al.*, 2001; Rothlin *et al.*, 2003). En consecuencia, este receptor farmacológicamente promiscuo es sensible a una gran diversidad de antagonistas (Tabla 1). Entre ellos se incluyen drogas que son agonistas o antagonistas nicotínicos, muscarínicos, gabaérgicos, glicinérgicos o serotoninérgicos (Elgoyhen *et al.*, 2001; Ellison *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 1995; McIntosh *et al.*, 2005; Rothlin *et al.*, 2003).  $\alpha 9\alpha 10$  también es sensible a antagonistas que no son drogas específicas de receptores de la familia Cys-loop. Una de ellas es el antagonista de receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) neramexane (Plazas *et al.*, 2007). Asimismo, algunos derivados de quinina son antagonistas de  $\alpha 9\alpha 10$  (Ballesteros *et al.*, 2005). Más aún,

ciertos opioides son también antagonistas de  $\alpha 9\alpha 10$  (Lioudyno *et al.*, 2002). Finalmente otro antagonista de  $\alpha 9\alpha 10$  es el bloqueante de canales de potasio KCNQ4, linopiridina (Gomez-Casati *et al.*, 2004). A pesar del gran número de antagonistas que se han caracterizado para  $\alpha 9\alpha 10$ , hasta el año 2012 solo se conocía un modulador positivo para este receptor. Este es la rianodina, un agonista de canales de calcio del retículo sarcoplasmático (Zorrilla de San Martín *et al.*, 2007).

Droga	Tipo	Efecto en $\alpha 9\alpha 10$
Nicotina	Agonista nicotínico	Antagonista
1,1-dimethyl-4 -phenylpiperazinium (DMPP)	Agonista nicotínico	Agonista parcial
Muscarina	Agonista muscarínico	Antagonista
Oxotremorine methiodide (Oxo-M)	Agonista muscarínico	Agonista parcial
D-tubocurarina	Antagonista nicotínico	Antagonista
$\alpha$ -bungarotoxina	Antagonista nicotínico	Antagonista
$\alpha$ -conotoxina PeIA	Antagonista nicotínico	Antagonista
$\alpha$ -conotoxina RgIA	Antagonista nicotínico	Antagonista
$\alpha$ -conotoxina B-VxXXIVA	Antagonista nicotínico	Antagonista
$\alpha$ -conotoxina Vc1.1	Antagonista nicotínico	Antagonista
Atropina	Antagonista muscarínico	Antagonista
Serotonina	Agonista serotoninérgico	Antagonista
trimethyl serotonin iodide (5HTQ)	Agonista 5HT <sub>3</sub>	Antagonista
1-( <i>m</i> -chlorophenyl)-biguanide	Agonista 5HT <sub>3</sub>	Antagonista
ICS-205,930	Antagonista 5HT <sub>3</sub>	Antagonista
Tropisetron	Antagonista 5HT <sub>3</sub>	Antagonista
Ondansetron	Antagonista 5HT <sub>3</sub>	Antagonista
MDL 72222	Antagonista 5HT <sub>3</sub>	Antagonista
Estricnina	Antagonista glicinérgico	Antagonista
Bicuculina	Antagonista gabaérgico	Antagonista
Endomorphin-1	Agonista mu-opioide	Antagonista
Dynorphin B	Agonista kappa-opioide	Antagonista
Linopiridina	Bloqueante de KCNQ2-4, I <sub>K,n</sub> e I <sub>M</sub>	Antagonista
Cloroquina	Antimalárico	Antagonista
Quinina	Antimalárico	Antagonista
Quinidina	Antimalárico	Antagonista
Neramexane	Antagonista de receptores de NMDA	Antagonista
Rianodina	Agonista de receptores de rianodina.	Potenciador

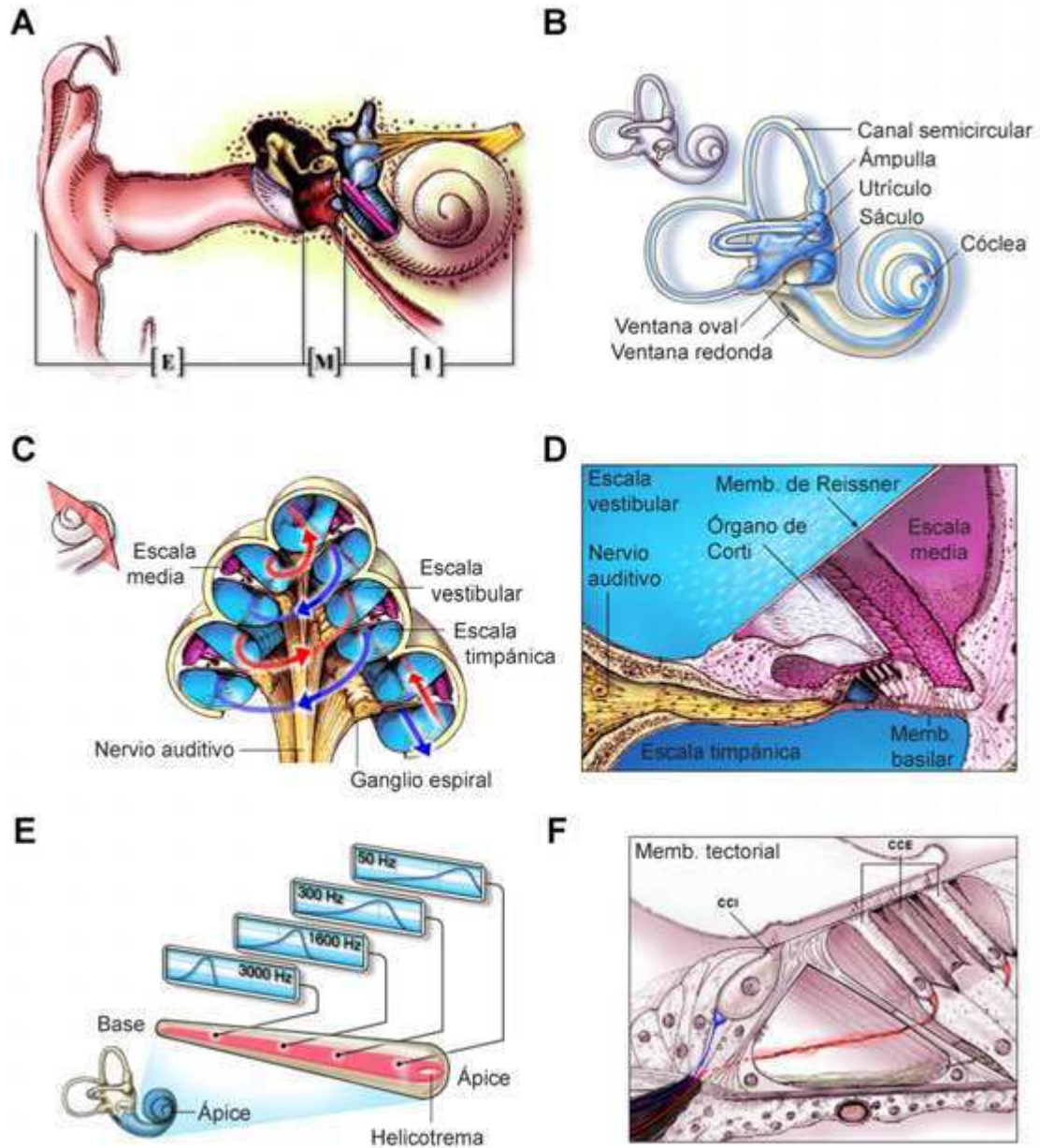
**Tabla 1:** Perfil farmacológico del receptor  $\alpha 9\alpha 10$  (Ballestero *et al.*, 2005; Elgoyhen *et al.*, 2001; Ellison *et al.*, 2006; Gomez-Casati *et al.*, 2004; Lioudyno *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2013; McIntosh *et al.*, 2005; Plazas *et al.*, 2007; Rothlin *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2013; Zorrilla de San Martin *et al.*, 2007).

## 2) Rol fisiológico del receptor nicotínico $\alpha 9\alpha 10$ .

Si bien se ha detectado la expresión de  $\alpha 9\alpha 10$  en diversos lugares como en los ganglios de la raíz dorsal o linfocitos (Lips *et al.*, 2002; Vincler *et al.*, 2006), solo se ha caracterizado su rol fisiológico en las células ciliadas del órgano de Corti en la cóclea, donde cumple una función en el proceso de la audición.

### 2.1) La Cóclea.

La cóclea es el órgano del oído interno responsable de la transducción de la información auditiva al SNC. Está encerrada en el laberinto óseo del hueso temporal del cráneo junto con el aparato vestibular (Fig. 5A, B). Está dividida en tres compartimientos llenos de fluido siguiendo la estructura de caracol del laberinto óseo: la escala media, la escala timpánica y la escala vestibular (Fig. 5C, D). Una membrana de dos células de espesor, llamada membrana de Reissner, separa la escala media de la escala vestibular. Esta membrana se considera acústicamente transparente, es decir que al oscilar los fluidos cocleares en respuesta a un estímulo sonoro, no afecta la transducción. En cambio, separando la escala media de la escala timpánica se encuentra una membrana acústicamente muy importante, la membrana basilar. La forma y rigidez de esta membrana compuesta por fibras de colágeno varía a lo largo de la cóclea: es gruesa y estrecha hacia la base de la cóclea (extremo cercano al tímpano) y se vuelve más fina y ancha hacia el ápice, lo que le permite generar pasivamente un pico de resonancia en respuesta a frecuencias específicas en posiciones también específicas (Fig. 5E). Este arreglo posicional de la respuesta a estímulos de diferentes frecuencias se denomina tonotopía.



**Figura 5:** A) Esquema representando al oído externo (E), oído medio (M) y oído interno (I). B) Esquema del oído interno con y sin el estribo sobre la ventana oval. C) Esquema de un corte transversal de la cóclea. Las flechas rojas indican la continuidad de la escala vestibular y las flechas azules la continuidad de la escala timpánica. D) Ampliación del esquema de un corte transversal de la cóclea. E) Esquema representativo de las propiedades tonotópicas (picos de resonancia a distintas frecuencias) de la membrana basilar en una cóclea esquemáticamente extendida. F) Esquema del órgano de Corti. La inervación aferente se esquematiza en azul y la eferente en rojo. Adaptado a partir de imágenes del sitio web “Journey into the World of Hearing” [www.cochlea.org](http://www.cochlea.org), con permiso de R Pujol et al., Montpellier.

La ventana oval y su membrana, la cual es estimulada por el estribo, se comunican con la escala vestibular (Fig. 5B). Esta última se comunica con la escala timpánica en el ápice de la cóclea a través de una abertura llamada helicotrema (Fig. 5C, E), por lo que a las escalas vestibular y timpánica se las considera como un solo compartimiento tanto mecánicamente como en composición de fluidos. El fluido que llena estas escalas se denomina perilinfa y es de composición similar al de un medio extracelular normal, mientras que el fluido de la escala media se denomina endolinfa y es muy rico en potasio (157 mM). La endolinfa se preserva aislada de la perilinfa por uniones estrechas entre las células que tapizan la escala media. La composición iónica de la endolinfa causa una diferencia de potencial de +80 mV con respecto a la perilinfa, lo que se conoce como potencial endococlear.

## 2.2) Células Ciliadas del Órgano de Corti.

El órgano de Corti se encuentra emplazado sobre la membrana basilar y constituye el epitelio sensorial del sistema auditivo. En él, se encuentran las células ciliadas, que son mecanosensoriales (Fig. 5F). En su membrana apical, estas células (a pesar de su nombre) presentan proyecciones llamadas estereocilios, los cuales están formados por filamentos de actina, a diferencia de los cilios. Es en estos estereocilios donde se encuentran los canales iónicos mecanotransductores. La identidad molecular de estos canales mecanotransductores aún no se conoce. Sin embargo, sabemos que se trata de un canal catiónico inespecífico de alta conductancia y cuya velocidad de apertura es la más rápida registrada para un canal iónico (Vollrath *et al.*, 2007). La membrana apical de las células ciliadas se encuentra inmersa en la endolinfa, mientras que la membrana basolateral está en la perilinfa. Uniones estrechas laterales cercanas al ápice de las células ciliadas permiten esta separación. En la zona basal, estas células se encuentran vinculadas a la membrana basilar a través de células de soporte. En la zona apical, los estereocilios se encuentran en contacto con una membrana acelular llamada membrana tectorial (Fig. 5F).

La onda de presión transmitida a través de la ventana oval a los fluidos cocleares hace oscilar de manera transversal a la membrana basilar en una onda que se desplaza a lo largo de su extensión (Fig. 5E). Esta onda “viajera” tiene una posición en la membrana basilar de máxima resonancia que depende de su frecuencia (Von Békésy, 1956), como se mencionó previamente cuando se introdujo el concepto de tonotopía. En



consecuencia, estímulos de alta frecuencia tendrán su resonancia máxima en la zona basal y los de baja frecuencia en la zona apical de la cóclea (Dallos, 1996). El órgano de Corti se mueve en conjunto con la membrana basilar, causando que los estereocilios de las células ciliadas se deflecten rítmicamente, en respuesta a este movimiento, contra la membrana tectorial. Al deflectarse los estereocilios, se activa rítmicamente el canal mecanotransductor, causando una despolarización oscilante en el potencial de membrana de las células ciliadas. Dada la composición de la endolinfa que rodea los estereocilios, la despolarización en respuesta a su deflexión es mediada por iones potasio (Crawford *et al.*, 1989; Fettiplace, 2009).

Hay dos tipos de células ciliadas en el órgano de Corti de los mamíferos: las células ciliadas externas e internas (CCE y CCI respectivamente, Fig. 5F). Las CCI reciben inervación principalmente aferente y en respuesta a la despolarización causada por la deflexión de sus estereocilios liberan glutamato a las dendritas de las neuronas del nervio auditivo, transduciendo así la información auditiva al SNC (Fuchs *et al.*, 2003). Por lo tanto las CCI son los fonoreceptores. Las CCE en cambio, reciben principalmente inervación eferente proveniente del tallo cerebral (Guinan *et al.*, 1983; Liberman, 1980). En su membrana plasmática lateral expresan una proteína motor llamada prestina. La prestina es sensible a cambios en el potencial de membrana a través de la unión reversible de aniones. En respuesta a esos cambios en el potencial de membrana, interactuando con el citoesqueleto, produce el acortamiento o elongación de las CCE (Ashmore, 2008). Este fenómeno se denomina electromotilidad de las CCE y se ha propuesto que introduce más energía cinética al sistema conformado por la membrana basilar y el órgano de Corti, amplificando de esta manera la intensidad de la percepción de los estímulos sonoros (Ashmore, 2008). El aumento en la sensibilidad, o ganancia, producido por esta amplificación es de ~40-50 dB (Liberman *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2004). La ausencia de este mecanismo de amplificación interno de la cóclea, mediado por las CCE y dependiente de prestina causa sordera (Ashmore, 2008). Interesantemente, la amplificación es no lineal, es decir que los estímulos de alta intensidad son amplificados en menor magnitud que los de baja intensidad (compresión), lo que incrementaría el rango dinámico de la audición (Robles *et al.*, 1986).

A pesar de la tonotopía causada por las propiedades pasivas de la membrana basilar, el grado de discriminación de frecuencias que permite este mecanismo pasivo es menor a los observados fisiológicamente (Robles and Ruggero, 2001). Más aún, este

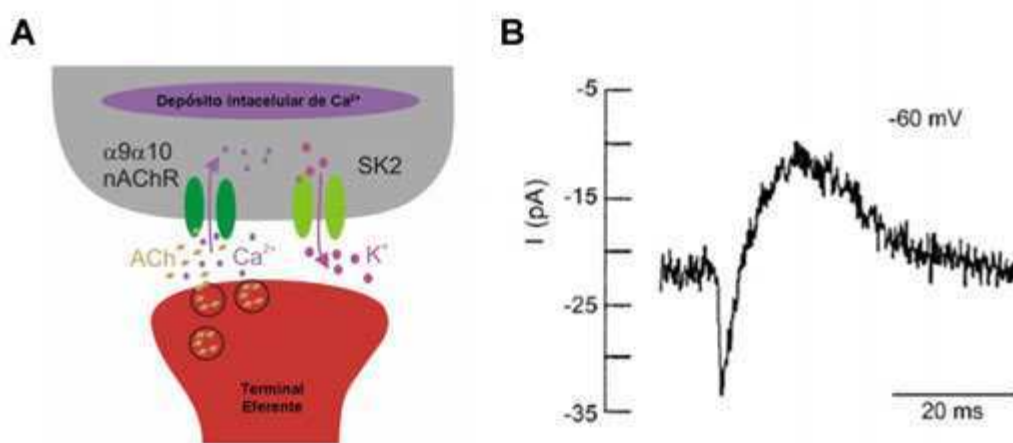
grado de discriminación de frecuencias depende de la integridad de las CCE, lo que sugiere que la función de amplificador coclear de estas células también afina activamente la discriminación de frecuencias, con respecto a lo observado pasivamente por Von Bekesy en cócleas post mortem (Dallos and Harris, 1978; Robles and Ruggero, 2001; Von Bekesy, 1956).

### 2.3) Sinapsis Eferente Medial Olivo-Coclear.

Previamente se mencionó que las CCE reciben inervación principalmente eferente desde el tallo cerebral (Guinan *et al.*, 1983; Liberman, 1980). Esta inervación se denomina eferente medial olivo-coclear, es colinérgica y forma contactos sinápticos en la membrana basolateral de las CCE en individuos adultos (Elgoyhen and Katz, 2012). Las CCE expresan en sus membranas postsinápticas al receptor  $\alpha 9\alpha 10$ , el cual es responsable de la neurotransmisión colinérgica eferente (Gomez-Casati *et al.*, 2005). Esta sinápsis eferente olivo-coclear es inusual ya que a pesar de ser colinérgica y de involucrar un receptor nicotínico, es inhibitoria (Elgoyhen and Katz, 2012). Como se detalló anteriormente, el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  tiene una permeabilidad a  $Ca^{2+}$  relativamente alta, por lo tanto, su activación en respuesta a la liberación de ACh causa una despolarización transitoria y un aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular (Gomez-Casati *et al.*, 2005; Weisstaub *et al.*, 2002). Este aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular activa un canal de  $K^+$  dependiente de  $Ca^{2+}$  de tipo SK2 (Fig. 6A, B), causando una gran corriente hiperpolarizante lenta en la célula ciliada (Elgoyhen and Katz, 2012). Los depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$  también participarían en la activación del canal SK2 (Lioudyno *et al.*, 2004).

La activación de esta sinápsis, mediante estimulación eléctrica de las fibras eferentes mediales olivo-cocleares causa una disminución en el potencial receptor de las CCI (Brown and Nuttall, 1984) y en la respuesta del nervio auditivo (Galambos, 1956). Más aún, esta estimulación reduce el movimiento de la membrana basilar (Murugasu and Russell, 1996). Toda esta evidencia sugiere que la neurotransmisión colinérgica eferente medial olivo-coclear inhibe la actividad motora de las CCE y por lo tanto su función de amplificador coclear (Elgoyhen and Katz, 2012; Mountain *et al.*, 1980; Siegel and Kim, 1982). Experimentalmente, esta inhibición eferente puede también activarse por la presentación de un estímulo sonoro al oído contralateral (Kujawa *et al.*, 1994).

Aún no se han elucidado completamente los roles fisiológicos de la inhibición eferente medial olivo-coclear. Entre las funciones sugeridas se incluye el control del rango dinámico de la audición (Gifford and Guinan, 1987), la detección de fuentes de sonido en ambientes ruidosos (Kawase *et al.*, 1993), enfocar la atención en estímulos visuales y no auditivos (Delano *et al.*, 2007) y la protección ante el trauma acústico (Liberman, 1991; Rajan, 2000). Particularmente para este último punto, se ha determinado que el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  cumple un rol importante, ya que aumentar la activación del mismo causa una protección ante el trauma acústico (Taranda *et al.*, 2009). Esto posiciona al receptor nicotínico  $\alpha 9\alpha 10$  como un posible blanco farmacológico terapéutico para la prevención de la pérdida de audición por exposición a altas intensidades de sonido (Elgoyhen *et al.*, 2009).



**Figura 6:** A) Esquema representativo de una sinápsis medial olivo-coclear. B) Trazo representativo de las corrientes evocadas por una CCE en respuesta a la actividad eferente. Adaptado de (Elgoyhen *et al.*, 2009).

#### 2.4) Pérdida de Audición por Trauma Acústico.

Existen dos principales tipos de pérdida de audición: la pérdida de audición conductiva, que afecta el oído externo y medio, y la sensorineural, que afecta el oído interno y/o al nervio auditivo (Hong *et al.*, 2013). La pérdida de audición conductiva es comúnmente temporaria y corregible terapéuticamente, mientras que la pérdida de audición sensorineural frecuentemente es irreversible (Hong *et al.*, 2013). La exposición a fuentes de sonido de altas intensidades (más de 85 dB) es el principal factor causante de la pérdida de audición sensorineural entre sus etiologías definidas (como causas genéticas, drogas ototóxicas o la edad) y constituye un problema substancial y creciente

para los sistemas de salud de países industrializados (Vio and Holme, 2005). Raramente la exposición a altas intensidades de sonido causa cambios en el oído externo o medio, por lo que personas con pérdida de audición por trauma acústico generalmente tienen tímpanos y oídos medios normales (Hong *et al.*, 2013).

Diversas ocupaciones demandan el desarrollo de medidas de protección auditiva, como por ejemplo la industria aeronáutica (Hong and Kim, 2001; Jaruchinda *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005), ferroviaria (Landon *et al.*, 2005; Seshagiri, 2003), agrícola (Beckett *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2005; Solecki, 2006), forestal (Neitzel and Yost, 2002), minera (Landen *et al.*, 2004), de la construcción (Neitzel *et al.*, 2008; Trabeau *et al.*, 2008) y militar (Barney and Bohnker, 2006; Bohnker *et al.*, 2004; Rovig *et al.*, 2004). Más aún, la exposición recreativa a altas intensidades de sonido también representa un riesgo común (Biassoni *et al.*, 2005; Serra *et al.*, 2005). En estos contextos, el uso de protectores auditivos físicos (ej. tapones) no siempre es suficiente, apropiado o posible y la protección auditiva podría aumentarse o mejorarse farmacológicamente (Lynch and Kil, 2005).

El grado de la pérdida de audición dependerá tanto de la intensidad como de la duración de los estímulos sonoros. Se suele separar las exposiciones a estímulos acústicos traumatizantes en dos grupos: exposiciones de corta duración a un estímulo puntual de muy alta intensidad, como una explosión o disparo (“impulse noise” o “shock noise”) y exposiciones sostenidas. Estos dos posibles escenarios de trauma producen pérdida de audición que se manifiesta gradualmente como un corrimiento (incremento) en dB del umbral de intensidad de sonido a partir del cual se perciben los estímulos para distintas frecuencias (Henderson and Hamernik, 1995).

La exposición puntual, repetida o continua a intensidades de sonido mayores que 85dB (Tabla 2) puede producir daño mecánico o metabólico por excitotoxicidad en el órgano de Corti (Borg *et al.*, 1995; Lim, 1986). Los corrimientos de umbral generados de este modo pueden ser temporales o permanentes (TTS y PTS respectivamente, por sus siglas en inglés) dependiendo de si algún mecanismo de reparación fue capaz de activarse en respuesta al trauma.

El daño mecánico normalmente se manifiesta como rotura, fusión o pérdida de la integridad estructural de los estereocilios de las células ciliadas (Fig. 7A-C) (Henderson *et al.*, 2006) o daños en sus membranas plasmáticas (Mulroy *et al.*, 1998). Los casos más extremos de daño mecánico se dan ante una exposición muy breve de muy alta intensidad (“impulse noise”) y se observan como desprendimientos del órgano de Corti

de la membrana basilar y/o rupturas en el epitelio que causan filtraciones de fluidos y la mezcla de endolinfa con perilinfa, afectando el potencial endococlear (Henderson *et al.*, 2006).

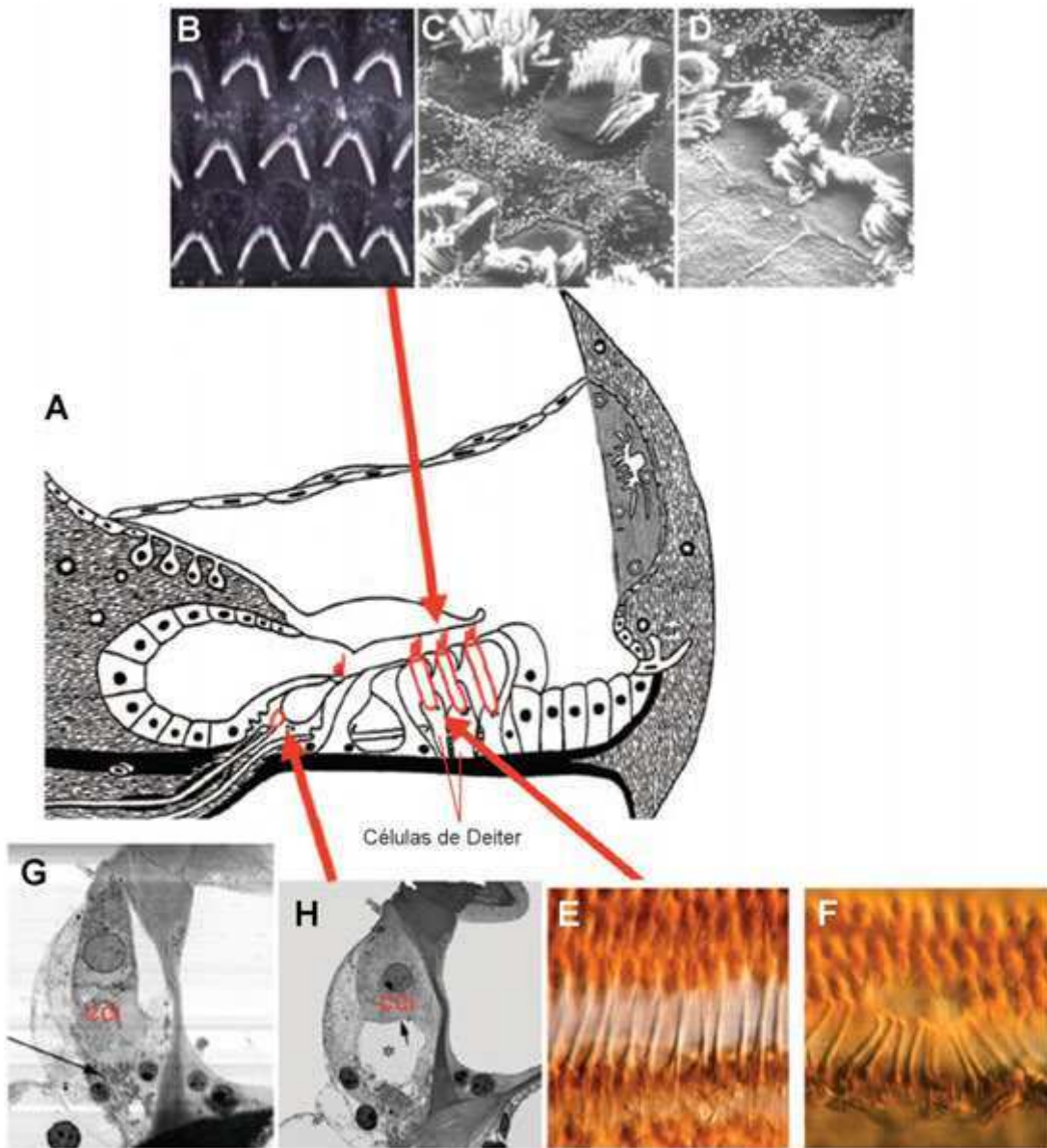
Presión de sonido (dB)	Duración	Fuente	Industria
140	<1 min	Armas de fuego, turbina de avión.	Militar, aeronáutica.
130	>1 min	Forja, martillo neumático.	Manufactura, minería, construcción.
120	>5 min	Parlantes amplificados.	Recreacional, músicos.
110	>15 min	Motores.	Ferrocarril, logística.
100	>1 hs.	Motosierra, carpintería.	Forestal, carpintería
90	>4 hs.	Motocicletas, cortadoras de pasto.	Recreacional
85	>8 hs.	Interior de cabinas de avión.	Aviación

**Tabla 2:** Niveles de presión de sonido que pueden dañar irreversiblemente la audición (Lynch and Kil, 2005).

La sobreestimulación del epitelio sensorial puede causar la pérdida de células ciliadas, lo cual es un daño irreversible ya que no se regeneran en la cóclea de los mamíferos (Birmingham-McDonogh and Reh, 2011). Aún se discute cuáles son los mecanismos causantes de la pérdida de células ciliadas. Según el consenso, la sobreestimulación podría causar una actividad metabólica intensa en las células ciliadas, siendo las CCE las más tempranamente susceptibles, causando la producción de radicales libres por parte de sus mitocondrias (Lynch and Kil, 2005; Ohinata *et al.*, 2000; Ohlemiller *et al.*, 1999; Yamane *et al.*, 1995). Esos radicales libres causarían la apoptosis o necrosis de las células ciliadas a través de daños en el ADN y la modificación de lípidos y proteínas (Henderson *et al.*, 2006). Los restos de las células ciliadas muertas serían removidos por células de soporte del órgano de Corti con actividad fagocítica, como las células de Deiter (Fig. 7A, E, F), reestableciendo de este modo la barrera de uniones estrechas que separan la endolinfa de la perilinfa (Ohlemiller, 2008).

Finalmente, altos niveles de sonido también pueden causar exitotoxicidad por glutamato (Pujol *et al.*, 1993), produciendo una hinchazón y ruptura de terminales dendríticos aferentes en la cóclea (Fig. 7A, G, H) (Spoendlin, 1971). Sin embargo estos

contactos sinápticos en algunos casos, aunque no siempre, podrían regenerarse (Robertson, 1983).



**Figura 7:** A) Esquema representativo del órgano de Corti. Se remarca en rojo sus componentes más susceptibles al trauma acústico. B) Microscopía electrónica de barrido de los estereocilios de CCEs normales. C) y D) Microscopía electrónica de barrido de los estereocilios de CCEs luego de una exposición a un estímulo sonoro traumático. E) Micrografía del órgano de Corti normal. F) Micrografía del órgano de Corti 15 min luego de una exposición a un estímulo sonoro traumático, evidenciando pérdida de CCE en la posición tonotópica correspondiente a la frecuencia del estímulo. G) Microscopía electrónica de transmisión mostrando un contacto sináptico aferente normal (flecha). H) Microscopía electrónica de transmisión mostrando la pérdida de contactos sinápticos aferentes por exitotoxicidad inducida por kainato (asterisco y flecha) patológicamente similar a lo inducido por ruido. Adaptado de (Henderson *et al.*, 2006).

Existe evidencia sustentando que los daños a los estereocilios pueden ser revertidos por mecanismos de reparación (Patuzzi, 2002). También mencionamos previamente que pueden reestablecerse los contactos sinápticos aferentes destruidos por exitotoxicidad. Por lo tanto se asocia estos dos tipos de daño a la cóclea con el TTS causado por ciertos tipos de exposiciones a trauma acústico. Una exposición moderada durante un período corto de tiempo puede causar un TTS que posiblemente se recupere dentro de las 24-48 hs. posteriores (Hong *et al.*, 2013). Sin embargo, esta no es una recuperación completa y sin consecuencias adversas ya que sufrir un TTS con cierta recurrencia puede producir una degeneración del nervio auditivo, acelerando la pérdida de audición relacionada con la edad (Kujawa and Liberman, 2009).

El daño responsable de una pérdida de audición con PTS es irreversible. Un ejemplo de esto es el deterioro del órgano de Corti que se produce en respuesta a “impulse noise”, que mencionamos previamente. Por otro lado, la exposición a fuentes de sonido de intensidades no tan extremas pero prolongadas puede causar la pérdida de células ciliadas por los mecanismos mencionados previamente. Las CCE de la zona basal de la cóclea son las más vulnerables, incluso ante un estímulo traumatizante de múltiples frecuencias (“broad band”) y por lo tanto son las primeras en perderse (Henderson *et al.*, 2006). La pérdida de CCE produce un aumento de hasta 40~60 dB en el umbral de detección de sonido y un detrimento en la discriminación de frecuencias codificadas por la zona de la cóclea donde se perdieron (Henderson *et al.*, 2006). Por lo tanto, el PTS causado por la pérdida de CCE normalmente comienza a manifestarse en la detección y/o discriminación de frecuencias agudas y en casos más extremos puede compensarse mediante el uso de un audífono. Sin embargo, exposiciones a estímulos traumáticos más prolongadas, extremas o repetidas pueden también causar la pérdida de CCI con una consecuente degeneración de las fibras del nervio auditivo, produciendo así una sordera que, dependiendo del trauma, puede abarcar más o menos frecuencias (Henderson *et al.*, 2006). Casos de sordera como este podrían tratarse mediante un implante coclear.

La pérdida de CCE causaría una reducción en la transducción de estímulos de ciertas frecuencias al SNC. De manera similar, la pérdida de CCI y la consecuente degeneración de fibras del nervio auditivo también modificarían los estímulos recibidos a nivel central. Existe evidencia sustentando que a consecuencia de esto, se activarían procesos de plasticidad homeostática, particularmente en la corteza auditiva, que

sugieren una degeneración también a nivel central en la vía auditiva (Yang *et al.*, 2011). Una notable patología asociada a estos cambios a nivel central es la percepción fantasma de un sonido conocida como acúfenos o tinnitus (Roberts *et al.*, 2010).



## **Objetivos.**

### **Objetivo General:**

Describir los requerimientos estructurales para la activación del receptor  $\alpha 9\alpha 10$ , estudiar las condiciones en las que alcanza una activación óptima y caracterizar nuevos moduladores positivos para este receptor.

### **Objetivos Particulares:**

1. Caracterizar el rol de cada subunidad en la formación de los sitios de unión a acetilcolina del receptor  $\alpha 9\alpha 10$ .
2. Caracterizar los determinantes estructurales de la dependencia del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular para su activación.
3. Caracterizar al ácido ascórbico como modulador positivo del receptor  $\alpha 9\alpha 10$ .

## Métodos.

### 1) Obtención de receptores mutantes y quiméricos.

#### 1.1) Mutagénesis dirigida.

Con el objetivo de identificar los residuos responsables de:

- La importancia de los componentes del sitio de unión a ACh
- La potenciación por  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular
- La potenciación por ácido ascórbico

del receptor  $\alpha 9\alpha 10$  de rata, obtuvimos subunidades mutantes por mutagénesis dirigida *in vitro*. En la tabla 3 se resumen los sitios mutados y las secuencias de los primers utilizados.

Especie	Mutación	Primer (5' a 3')	
Rata	$\alpha 9R46A$	Fw	GGACATGGACGAGGCAAACCAGATTCTGACAGCC
		Rv	GGCTGTCAGAATCTGGTTTGCCTCGTCCATGTCC
Rata	$\alpha 10R46A$	Fw	GATCATTGATATGGATGAAGCGAACCAGGTGCTGACCTTG
		Rv	CAAGGTCAGCACCTGGTTCGCTTCATCCATATCAATGATC
Rata	$\alpha 9W55T$	Fw	CTGACAGCCTATCTAACGATCCGCCAAACCTGG
		Rv	CCAGGTTTGGCGGATCGTTAGATAGGCTGTGTCAG
Pollo	$\alpha 9W55T$	Fw	CCAAATTTTGACAGCTTACTTAAACGATTCGACAAAGCTGG
		Rv	CCAGCTTTGTGCAATCGTTAAGTAAGCTGTCAAAATTTGG
Rata	$\alpha 10W55T$	Fw	GCTGACCTTGTACCTGACGATCCGGCAAGAGTGG
		Rv	CCACTCTTGCCGGATCGTCAGGTACAAGGTCAGC
Pollo	$\alpha 10W55T$	Fw	CTCACCTCCTACCTGACGGTCCGCCAGGCCTGG
		Rv	CCAGGCCTGGCGGACCGTCAGGTAGGAGGTGAG
Rata	$\alpha 9R57A$	Fw	CAGCCTATCTATGGATCGCCCAAACCTGGCACGATG
		Rv	CATCGTGCCAGGTTTGGCGATCCATAGATAGGCTG
Rata	$\alpha 10R57A$	Fw	CCTTGTACCTGTGGATCGCGCAAGAGTGGACAGATGCC
		Rv	GGCATCTGTCCACTCTTGCAGCAGGTACAAGG
Rata	$\alpha 10R129V$	Fw	CGCAGCTCGTGCGTTGTGGACGTGTCTGCC
		Rv	GGCAGACACGTCCACAACGCACGAGCTGCG
Rata	$\alpha 10N173D$	Fw	GCCGACTTCGTGGAGGACGTTGAATGGCGGG
		Rv	CCCGCCATTCAACGTCCTCCACGAAGTCGGC
Rata	$\alpha 9E175Q$	Fw	CATTGAAGATGTGCAATGGGAGGTCCATGGC
		Rv	GCCATGGACCTCCATTGCACATCTTCAATG

Rata	$\alpha$ 10E175Q	Fw	GCCGACTTCGTGGAGAACGTTCAATGGCGGGTGCTGGGC
		Rv	GCCCAGCACCCGCCATTGAACGTTCTCCACGAAGTCGGC
Rata	$\alpha$ 9Y190T	Fw	GTAAAGAACGTCATCTCCACTGGCTGCTGCTCCGAGCC
		Rv	GGCTCGGAGCAGCAGCCA GTGGAGATGACGTTCTTTAC
Rata	$\alpha$ 10Y190T	Fw	GGCGGGTCCTCACC ACTGGCTGCTGCTCTG
		Rv	CAGAGCAGCAGCCA GTGGTGAGGACCCGCC
Rata	$\alpha$ 9CC192/193SS	Fw	CGTCATCTCCTATGGCTCCTCTCCGAGCCTTACC
		Rv	GGTAAGGCTCGGAGGAGGAGCCATAGGAGATGACG
Rata	$\alpha$ 10CC192/193SS	Fw	GTCCTCACCTATGGCTCCTCTCTGAGCCCTACC
		Rv	GGTAGGGCTCAGAGGAGGAGCCATAGGTGAGGAC
Rata	$\alpha$ 10A211S	Fw	GCTGCGCCGCCGCTCTGCAGCCTACGTGTGC
		Rv	GCACACGTAGGCTGCAGAGCGGGCGGCGCAGC
Rata	$\alpha$ 10S270N	Fw	CCGAGAGCATGCCACCTGCAGAAAATGTTCCACTCATCG GAAAGTACTATATG
		Rv	CATATAGTACTTTCCGATGAGTGGAACATTTTCTGCAGGT GGCATGCTCTCGG
Rata	$\alpha$ 9V13'T	Fw	CCTATTGGCCATGACTACGTTTCAACTAATGGTGCCAGAG
		Rv	CTCTGCCACCATTAGTTGAAACGTAGTCATGGCCAATAGG
Rata	$\alpha$ 10V13'T	Fw	CGTCACCGTGCTCCTGGCGCTCACCACCTTCCAAGTATC CTGGCCGAGAGC
		Rv	GCTCTCGGCCAGGATCAGTTGGAAGGTGGTGAGCGCCAG GAGCACGGTGACG

**Tabla 3:** Secuencias de los primers empleados para mutagénesis dirigida. Los sitios mutados se resaltan en amarillo.

Las subunidades mutantes  $\alpha$ 9V13'T y  $\alpha$ 10V13'T fueron producidas por la Dra. Paola Plazas (Plazas *et al.*, 2005a). Las subunidades mutantes  $\alpha$ 9CC192/193SS y  $\alpha$ 10CC192/193SS fueron producidas por Jessica Savino. Las reacciones de mutagénesis se realizaron utilizando el kit QuickChange II Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Para cada reacción, se mezclaron los siguientes componentes:

Componente	Volumen ( $\mu$ l):
Buffer (5X).	5
ADN templado.	1
Primer sentido (50 ng/ $\mu$ l).	2,5
Primer antisentido (50 ng/ $\mu$ l).	2,5
dNTP mix.	1
H <sub>2</sub> O (c.s.p. 50 $\mu$ l).	37
PfuUltra ADN polimerasa (2.5 U/ $\mu$ l).	1

Como ADN templado se utilizaron plásmidos que contenían los ADNc codificando las subunidades  $\alpha$ 9 y  $\alpha$ 10 de *Rattus norvegicus* o *Gallus gallus*. Empleamos el siguiente protocolo de amplificación en un termociclador MJ Research PTC-200 (Bio-Rad, Hercules, Calif., USA):

- 1- 95°C 30 segundos.
- 2- 95°C 50 segundos.
- 3- 55°C 1 minuto.
- 4- 68°C 5 minutos.
- 5- Ir al paso 2, 16 veces.
- 6- 68°C 7 minutos.
- 7- 15°C sostenido.

Los productos de las amplificaciones fueron digeridos con la enzima *DpnI*. Esta enzima corta específicamente ADN metilado; de esta forma, se digieren las cadenas parentales, conservando solamente las portadoras de la mutación. El producto de la digestión fue utilizado para transformar bacterias *SoloPack Gold Supercompetent Cells* (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Se crecieron cultivos a partir de las colonias obtenidas y se purificó ADN plasmídico utilizando el kit Wizard Plus SVMinipreps ADN Purification System (Promega, Madison, WI, USA). Para confirmar la incorporación de la mutación (y corroborar la ausencia de posibles errores introducidos por la polimerasa en la amplificación) los productos de la mutagénesis fueron secuenciados (Macrogen, Seoul, Korea).

## 1.2) Producción de subunidades quiméricas.

Con el objetivo de caracterizar la importancia de los componentes del sitio de unión a ACh del receptor  $\alpha 9\alpha 10$  de rata y los determinantes estructurales responsables de la potenciación por  $Ca^{2+}$  extracelular del receptor, empleamos las siguientes subunidades quiméricas:

- $\alpha 9\chi$ : Subunidad  $\alpha 9$  con el dominio transmembrana e intracelular de  $5HT_{3A}$ .
- $\alpha 10\chi$ : Subunidad  $\alpha 10$  con el dominio transmembrana e intracelular de  $5HT_{3A}$ .
- $\alpha 10\chi_{RR}$ : Subunidad  $\alpha 10$  con el dominio extracelular de  $\alpha 9$ .
- $\alpha 10\chi_{FullExtra}$ : Subunidad  $\alpha 10$  con el dominio extracelular, el loop TM2-TM3 y el segmento N-terminal de TM1 de  $\alpha 9$ .

Las subunidades  $\alpha 9\chi$  y  $\alpha 10\chi$  fueron provistas por Neil Millar, UCL, Reino Unido (Baker *et al.*, 2004). Brevemente, para obtenerlas se construyeron los ADNcs conteniendo el dominio extracelular N-terminal de  $\alpha 9$  o  $\alpha 10$  fusionado a los dominios transmembrana e intracelular de la subunidad  $5HT_{3A}$  según se describió en trabajos previos para la construcción de la quimera  $\alpha 7^{(V201)}/5HT_{3A}$  (Cooper and Millar, 1998; Eisele *et al.*, 1993). Se introdujo un sitio de corte para *BclI* en los ADNcs de  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  por PCR en posiciones análogas a la V201 en la secuencia de  $\alpha 7$ , justo antes de la primer región transmembrana, M1. Los productos de PCR de  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  fueron subclonados en el plásmido de expresión pRK5- $\alpha 7^{(V201)}/5HT_{3A}$  (Cooper *et al.*, 1999), luego de remover la secuencia de  $\alpha 7$  por digestión con enzimas de restricción, para obtener los plásmidos pRK5- $\alpha 9^{(L209)}/5HT_{3A}$  y pRK5- $\alpha 10^{(L206)}/5HT_{3A}$ .

La subunidad quimérica  $\alpha 10\chi_{RR}$  fue producida por la Dra. Paola Plazas mediante el método de PCR de fusión (Szewczyk *et al.*, 2006). Brevemente se realizaron tres reacciones de PCR empleando la enzima Pfu y los primers listados en la tabla 4.

Primer		Secuencia (5' a 3')
GEM	Fw	GGGCGAATTAATTCGAGCTC
	Rv	GCTATGACCATGATTACGCC
RR	Fw	CACACGTAGGCTGCAGCGCGGCgcttcagaaggagagtgagggtg
	Rv	caccttcactctccttctgaagCGCCGCGCTGCAGCCTACGTGTG

**Tabla 4:** Secuencia de los primers empleados para la construcción de la quimera  $\alpha 10\chi_{RR}$ . En la secuencia de los primers “RR” se marca en mayúsculas la secuencia correspondiente a  $\alpha 9$  y en minúsculas la secuencia correspondiente a  $\alpha 10$ .

La primera reacción de PCR involucró el vector  $\alpha 9pGEMHE$  como templado y los primers GEM Fw y RR Rv, siguiendo el siguiente programa:

- 1- 95°C 5 minutos.
- 2- 95°C 1 minuto.
- 3- 68°C 1 minuto.
- 4- 72°C 1 minuto.
- 5- ir al paso 2, 30 veces.
- 6- 72°C 10 minutos.
- 7- 15°C sostenido.

La segunda reacción de PCR involucró el vector  $\alpha 10pSGEM$  como templado y los primers RR Fw y GEM Rv, siguiendo el siguiente programa:

- 1- 95°C 5 minutos.
- 2- 95°C 1 minuto.
- 3- 60°C 1 minuto.
- 4- 72°C 1,5 minuto.
- 5- ir al paso 2, 30 veces.
- 6- 72°C 10 minutos.
- 7- 15°C sostenido.

La tercera reacción empleo los productos de la primer y segunda PCR como templados y los primers GEM Fw y GEM Rv, siguiendo el siguiente programa:

- 1- 95°C 5 minutos.
- 2- 95°C 1 minuto.
- 3- 66°C 1 minuto.
- 4- 72°C 1,5 minuto.
- 5- ir al paso 2, 30 veces.
- 6- 72°C 10 minutos.
- 7- 15°C sostenido.

El producto de la tercera reacción fue clonado en un vector pSGEM previamente linealizado con la enzima *EcoRV*.

Para producir la quimera  $\alpha 10\chi_{FullExtra}$  empleamos el kit QuikChange<sup>®</sup> Multi Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA, USA), utilizando los primers listados en la tabla 5.

Primer	Secuencia (5' a 3')
$\alpha 10\chi_{RR}$ (N-term TM1)	GGGCAGCAGGAGGTTGACGATGTAGAAATGAAGAAGCGGGCGCTTCAG
$\alpha 10\chi$ (TM2-TM3)	GGCATGCTCTCGGCCACCATCAGCTGGAAGACGG

**Tabla 5:** Secuencia de los primers empleados para la construcción de quimeras por mutagénesis múltiple. Los sitios mutados se resaltan en amarillo.

Utilizamos como templado ADN plasmídico conteniendo el ADNc codificante para la subunidad quimérica  $\alpha 10\chi_{RR}$  y los primers  $\alpha 10\chi_{RR}$ (N-term TM1) y  $\alpha 10\chi$ (TM2-TM3). Para la reacción se ensamblaron los siguientes componentes:

Componente	Volumen ( $\mu$ l)
10 $\times$ QuikChange <sup>®</sup> Multi reaction buffer.	2,5
ADN templado.	1
Primers antisentido (50 ng/ $\mu$ l).	1,25 c/u
dNTP mix.	1
H <sub>2</sub> O (c.s.p. 25 $\mu$ l).	14,5
QuikChange <sup>®</sup> Multi enzyme blend.	1

El protocolo de amplificación, implementado en un termociclador MJ Research PTC-200 (Bio-Rad, Hercules, Calif., USA) fue el siguiente:

- 1- 95°C 1 minuto.
- 2- 95°C 1 minuto.
- 3- 55°C 1 minuto.
- 4- 65°C 5 minutos.
- 5- Ir al paso 2, 30 veces.
- 6- 65°C 10 minutos.
- 7- 15°C sostenido.

Nuevamente, los productos de las amplificaciones fueron digeridos con la enzima *DpnI* y el producto de la digestión fue utilizado para transformar bacterias *SoloPack Gold Supercompetent Cells* (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Se crecieron cultivos a partir de las colonias obtenidas y se purificó ADN plasmídico utilizando el kit Wizard Plus SV Minipreps ADN Purifications System (Promega, Madison, WI, USA). Se confirmó la incorporación de los quimerismos (y corroboramos la ausencia de

posibles errores introducidos por la polimerasa en la amplificación) secuenciando los plásmidos producidos (Macrogen, Seoul, Korea).

## 2) Expresión de receptores nicotínicos recombinantes en oocitos de *X. laevis*.

### 2.1) Preparación de ARNc.

El ADNc codificante para la subunidad  $\alpha 9$  de rata fue subclonado en el vector pGEM-HE. Este vector posee los segmentos 5'-UTR y 3'-UTR del gen de  $\beta$ -globína de *Xenopus laevis*; esto lo hace un vector ideal para la expresión de proteínas en oocitos de *Xenopus laevis*. Los ADNc codificantes para las subunidades  $\alpha 4$ ,  $\alpha 7$  y  $\beta 2$  de rata subclonados en el vector pSGEM (vector derivado del pGEM-HE con el agregado del sitio múltiple de clonado del vector *pBluescript* (Stratagene, La Jolla, CA, USA)), fueron provistos por Jim Boulter, UCLA, USA. Los ADNc codificantes para las subunidades  $\alpha 10$  de rata,  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  de pollo fueron subclonados en el vector pSGEM.

Los plásmidos conteniendo los ADNc de los diferentes receptores fueron linealizados con la enzima de restricción *NheI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Los productos de las digestiones fueron tratados con proteinasa K (Sigma-Aldrich, Argentina): 1/10 volumen (200 mg/ml), 1 hora a 55°C, y purificados utilizando el kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, GmbH-Hilden, Alemania). La concentración de los plásmidos linealizados se determinó mediante comparación con el marcador de masa 1 kb *ladder* (Invitrogen, Life Technologies, Argentina, Argentina) en geles de agarosa al 1%.

Los plásmidos linealizados fueron utilizados como templado para la síntesis *in vitro* de ARNc mediante el kit RiboMAX™ Large Scale RNA Production System (Promega, Madison, WI, USA). Las reacciones de transcripción se realizaron en presencia de un análogo del cap, Me<sub>7</sub>G(5')ppp(5')G (Promega, Madison, WI, USA), en proporción 4:1 con respecto al GTP. Los ARNc obtenidos fueron cuantificados en geles de agarosa 1% y utilizados para la microinyección de oocitos de *Xenopus*.

### 2.2) Obtención de oocitos de *X. laevis*.

Se utilizaron hembras de *Xenopus laevis* obtenidas comercialmente (Nasco, Modesto, CA, EE.UU.). Se mantuvieron en un bioterio adecuado, de ambiente



controlado (18-20 °C), con un régimen de 12 hs. luz /12 hs. oscuridad, en grupos de dos, en recipientes de 10 litros con agua limpia y sin cloro, y alimentadas dos veces por semana. Para la obtención de los oocitos, las ranas fueron anestesiadas por inmersión durante 30 min en una solución de 1,5 g/l del etil ester del ácido 3-aminobenzoico (Sigma-Aldrich, Argentina) y 1 g/l de NaHCO<sub>3</sub> disueltos en agua de clorada. Mediante una pequeña incisión en el abdomen, se les extrajo lóbulos del ovario, luego se suturó la herida y se mantuvo a las ranas operadas por dos semanas en cuarentena. Las ranas fueron operadas hasta cuatro veces con un periodo de como mínimo dos meses entre operaciones, antes de ser sacrificadas por una dosis letal de anestesia. Los lóbulos extraídos fueron abiertos bajo lupa con ayuda de pinzas y luego tratados con una solución de colagenasa tipo I (Worthington Biochem Corp. Lakewood, NJ, USA) 2 mg/ml (400U/ml), disuelta en una solución salina sin Ca<sup>2+</sup> de la siguiente composición (en mM): NaCl 96, KCl 2, HEPES 5, MgCl<sub>2</sub> 5, pH 7,6, con agitación lenta para disgregar el tejido y remover la capa folicular durante 4 horas. Luego, los oocitos fueron lavados cinco veces con la misma solución para eliminar los restos de colagenasa. Oocitos de estadios maduros (estadios V y VI) fueron seleccionados bajo lupa de acuerdo a su tamaño y apariencia. Luego se los mantuvo, previo a su microinyección, de un día para el otro a 18°C en solución de Barth (en mM): NaCl 88, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0,33, CaCl<sub>2</sub> 0,41, KCl 1, MgSO<sub>4</sub> 0,82, NaHCO<sub>3</sub> 2,4, HEPES 10 y gentamicina 0,1 mg/ml, pH 7,6, en viales, en grupos de no más de 50 oocitos por vial.

### 2.3) Inyección de oocitos de *X. laevis*.

Los oocitos seleccionados fueron inyectados dentro de las 24 hs. posteriores a su colagenización. La inyección del ARNc se realizó utilizando un microinyector automático (Drummond Scientific Company, Broomall, PA, EE.UU.) y capilares de vidrio (Drummond Scientific Company, Broomall, PA, EE.UU.), estirados por calor utilizando un estirador de pipetas modelo PB-7 (Narishige Co. Ltd, Tokio, Japón). Las pipetas se llenaron con aceite mineral y en su extremo se cargaron con 2 µl de solución de ARNc de ~0,2 µg/µl. Los oocitos se colocaron en una caja de Petri de 35 mm de diámetro cuyo fondo posee una membrana de polietileno enrejada que limita su movimiento y se inyectaron individualmente.

Para estudiar los receptores α7 homoméricos, los oocitos fueron inyectados con 0,01-1 ng (50 nl) de ARNc correspondiente a la subunidad α7 de rata. Para estudiar

receptores heteroméricos salvajes, mutantes o quiméricos, los oocitos fueron inyectados con 0,01-1 ng (50 nl) de ARNc conteniendo cantidades equimolares de las subunidades recombinantes  $\alpha 9$  (salvaje, mutante o quimérica) y  $\alpha 10$  de pollo o rata, o  $\alpha 4$  y  $\beta 2$  de rata.

### 3) Registros electrofisiológicos.

Dos a cuatro días luego de la inyección, se evaluaron las propiedades de los receptores recombinantes expresados por los oocitos mediante la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos (TEVC, *two-electrode voltage clamp*). Se utilizaron micropipetas de vidrio (resistencia  $\sim 1-2 \text{ M}\Omega$ ) estiradas con un estirador de pipetas modelo PB-7 (Narishige Co. Ltd, Tokio, Japón). Las mismas fueron llenadas con una solución de KCl 3M. Los electrodos de registro de Ag/AgCl, insertos en las micropipetas, se conectaron a los cabezales de un amplificador Oocyte Clamp OC-725B o C (Warner Instruments Corp., Hamden, CT, USA). Los registros fueron filtrados a una frecuencia de corte de 10Hz mediante un filtro 900BT Tunable Active Filter (Frequency Devices Inc., Ottawa, IL, USA). La adquisición de datos y la generación de protocolos de voltaje se llevó a cabo empleando una interfaz Patch Panel PP-50 LAB/1 interphase (Warner Instruments Corp., Hamden, CT, USA) a una frecuencia de muestreo de 10 puntos por segundo. Cada cabezal se acopló a un micromanipulador mecánico para el posicionamiento fino de los electrodos. El baño de la preparación fue llevado a una “tierra virtual” empleando un cabezal de baño conectado a dos alambres de Ag/AgCl sumergidos en soluciones separadas de KCl 3M y conectadas al baño a través de dos puentes de KCl-agar. El uso de puentes de agar reduce la ocurrencia de fluctuaciones en las corrientes de fuga ante la aplicación de soluciones con cambios en la composición iónica (concentración de  $\text{Cl}^-$ ) o ante cambios en las propiedades oxidoreductoras del baño que puedan afectar el equilibrio electroquímico del alambre de Ag/AgCl que lleva a tierra el baño de la preparación. Estos alambres de Ag/AgCl conectados al cabezal de baño actúan como un electrodo de voltaje y otro de corriente, fijando activamente mediante un circuito de retroalimentación el potencial del baño a 0 mV con respecto a la tierra a la que está conectado el amplificador. La ventaja del circuito empleando una “tierra virtual” es que produce los menores niveles de ruido y no requiere de una compensación de una resistencia en serie entre el baño y los electrodos que llevarían a tierra, como la que podrían aportar los puentes de agar.

Todos los registros se realizaron a un potencial de sostén de  $-70$  mV. Durante los registros electrofisiológicos, los oocitos fueron sometidos a un flujo continuo ( $\sim 10$  ml/min) de solución de Ringer (en mM): NaCl 115, KCl 2,5,  $\text{CaCl}_2$  1,8 y HEPES 10, pH 7,2. En todos los casos la ACh fue añadida al baño, diluida en la solución de perfusión, a partir de soluciones madre de una concentración 100 mM. Realizamos lavados con solución de Ringer de 3 min entre aplicaciones para que la desensibilización de los receptores no afecte nuestros resultados.

Los oocitos poseen canales endógenos de cloruro activables por  $\text{Ca}^{2+}$  (Boton *et al.*, 1989; Miledi and Parker, 1984). Para minimizar la activación de estos canales, en respuesta a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los receptores recombinantes, los oocitos fueron incubados en presencia de un quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  capaz de atravesar la membrana, BAPTA-AM (acetoximetilester del ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético) en concentración 100  $\mu\text{M}$ , durante las 3 horas previas a los registros electrofisiológicos. Una vez dentro del oocito, este compuesto es escindido por las esterasas endógenas pasando a su forma ácida, lo cual impide que vuelva a atravesar la membrana plasmática. Estudios previos han demostrado que este tratamiento es capaz de quelar efectiva y rápidamente los iones  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares y, por lo tanto, de minimizar la activación de la corriente de  $\text{Cl}^-$  (Gerzanich *et al.*, 1994). Todos los registros fueron realizados en oocitos incubados en BAPTA, a no ser que se indique lo contrario.

En los experimentos en que se utilizaron soluciones extracelulares conteniendo concentraciones bajas de  $\text{Ca}^{2+}$ , se emplearon oocitos inyectados con 7,5 ng de un oligonucleótido (5'GCTTTAGTAATTCCCATCGTCCCATGTTTC 3') antisentido del ARN mensajero de conexina 38 (Ebihara, 1996; Gerzanich *et al.*, 1994; Katz *et al.*, 2000) para minimizar la activación de las corrientes catiónicas no selectivas a través de los canales *hemigap junction* del oocito, activadas por la disminución de la concentración de iones divalentes extracelulares.

### 3.1) Curvas concentración – respuesta.

Las curvas de concentración-respuesta se obtuvieron normalizando las amplitudes de las respuestas obtenidas en las diferentes concentraciones de ACh a la respuesta máxima al agonista en cada oocito. Se graficaron las medias y los errores

estándar de las medias (S.E.M.) de todos los oocitos ensayados. Los datos experimentales fueron ajustados a la ecuación empírica de Hill:

$$\frac{I}{I_{m\acute{a}x}} = \frac{A^n}{A^n + EC_{50}^n}$$

donde I es la amplitud de la corriente producida por el agonista a una concentración A;  $I_{m\acute{a}x}$  es la amplitud de la corriente máxima producida por una concentración saturante del agonista;  $EC_{50}$  es la concentración de agonista que produce el 50% de la respuesta máxima y n es el coeficiente de Hill.

### 3.2) Curvas corriente – potencial.

El protocolo de estimulación para obtener las curvas de corriente en función del potencial (I-V) consistió en una rampa lineal desde -120 a +50 mV con una duración de 2 segundos, partiendo de un potencial de sostén de -70 mV. Las rampas se efectuaron durante la aplicación de ACh 10  $\mu$ M, 3 segundos luego que la amplitud de respuesta alcanzara una meseta estable. La corrección de las corrientes de fuga se realizó mediante la sustracción digital del promedio de dos curvas I-V obtenidas mediante la aplicación de rampas de voltaje realizadas antes de la aplicación de la ACh y después que el oocito volviera a la línea de base al finalizar la aplicación de ACh. Se analizó el efecto de diferentes tratamientos sobre la rectificación de las curvas I-V obteniendo la relación entre la amplitud de corriente a +40 y a -90 mV. Se promediaron los valores así obtenidos para cada oocito. Para determinar el potencial de reversión de las curvas I-V se promedió para cada curva los límites del intervalo de voltaje donde la curva experimental intersectaba el eje x. Luego para cada población de datos se promediaron las medias y se propagaron los errores estándar.

### 3.3) Evaluación de la modulación por $Ca^{2+}$ extracelular.

El efecto del  $Ca^{2+}$  extracelular sobre las respuestas a ACh de los receptores  $\alpha 9\alpha 10$  de rata WT, mutantes o quiméricos se estudió midiendo las amplitudes de respuesta a una concentración de ACh cercana al  $EC_{50}$  ó saturante (1 mM), al variar la concentración de  $Ca^{2+}$  extracelular de 0 nominal a 3 mM, en solución de Ringer.

Preincubamos los oocitos 2 min a cada concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  antes de co-aplicar ACh. Los valores de las amplitudes obtenidos para cada concentración fueron normalizados a la amplitud obtenida en  $\text{Ca}^{2+}$  0 mM o  $\text{Ca}^{2+}$  1,8 mM, dependiendo del experimento.

#### 4) Ensayos de unión a radioligando.

Los ensayos de unión a radioligando fueron llevados a cabo como parte de una colaboración con el laboratorio del Dr. Neil Millar en el University College de Londres en la cual participaron JasKiran Gill y el Dr. Toby Collins. Para los ensayos de unión se empleó la línea celular tsA201 derivada de la línea HEK 293. Las células se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Invitrogen, Paisley, UK) conteniendo 2 mM L-GlutaMAX (Invitrogen) más 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (Sigma, Poole, UK) con penicilina (100 U/ml) y streptomycin (100 µg/ml). Se mantuvieron las células en una incubadora de atmósfera humidificada conteniendo 5%  $\text{CO}_2$  y a 37°C. Las células fueron transfectadas en forma transitoria empleando el reactivo Effectene (QIAGEN, Crawley, UK) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En todos los casos, las células se transfectaron durante 24 hs. y se ensayó la expresión de las quimeras 40 a 48 hs. después de la transfección. Para asegurar que los niveles de unión de radioligando no fueran influenciados por diferencias en las cantidades de ADNc, cuando se expresaron subunidades individuales o en combinación, la cantidad de ADN plasmídico total se mantuvo constante. Se logró esto incluyendo al vector vacío como ADN plasmídico extra cuando se transfectaron subunidades individuales.

Los ensayos de unión a [ $^3\text{H}$ ]- $\alpha$ -Bungarotoxina o [ $^3\text{H}$ ]-methyllycaconitina (actividad específica, 56 y 26 Ci/mmol; PerkinElmer, Cambridge, UK y Tocris Cookson Ltd, Avonmouth, UK; respectivamente) en preparaciones de membranas se llevaron a cabo según trabajos previos del laboratorio (Harkness and Millar, 2002; Lansdell and Millar, 2000). Típicamente, se incubaron con radioligando (20 nM [ $^3\text{H}$ ]- $\alpha$ -Bungarotoxina ó 40 nM [ $^3\text{H}$ ]-methyllycaconitina) membranas conteniendo 10-100 µg de proteína durante 150 min a 4°C en un volumen total de 300 µl y en presencia de los inhibidores de proteasas leupeptin (2 µg/ml) y pepstatin (1 µg/ml), y seroalbumina bovina (0,5%) para prevenir la unión inespecífica. En los experimentos de unión a saturación, se determinó la unión inespecífica con la adición de 1 mM carbamylcolina y 1 mM nicotina ó 1 mM ACh a las muestras. La unión de radioligando se evaluó por

filtración en filtros Whatman GF/B previamente humedecidos en polyethylenimina 0,5% seguida de un rápido lavado con buffer fosfato 10 mM helado usando un cosechador de células Brandel y la radioactividad se determinó por contador de centelleo. El número de sitios de unión en las preparaciones de membranas empleadas en las mediciones fue lo suficientemente bajo como para evitar la depleción significativa (>10%) de radioligando a bajas concentraciones de éste. Se realizaron ensayos preliminares para asegurar que los tiempos de incubación fuesen lo suficientemente largos como para que la unión de radioligando alcanzara un equilibrio. Las concentraciones de proteína se determinaron mediante un ensayo de Bradford usando patrones de seroalbumina bovina (Bio-Rad, Hercules, CA). Cada ensayo se realizó por triplicado.

#### 5) Modelado de homología.

Los modelos de homología del dominio extracelular del receptor  $\alpha 9\alpha 10$  de rata se construyeron con el programa Modeller 9v8 (Sali and Blundell, 1993), considerando la estequiometría conocida (Plazas *et al.*, 2005b) y un orden de ensamblaje de las subunidades alternado. Empleamos la cristalografía de la AChBP en forma apo de *Aplysia californica* (2W8E.pdb) como molde, ya que es la cristalografía de una AChBP con mayor resolución (1,9Å). Empleamos el script align2d\_single.py de Modeller para construir un alineamiento entre la subunidad de la AChBP y las secuencias de los dominios extracelulares las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  de rata, teniendo en cuenta de este modo información estructural en la matriz de puntuación para la construcción del alineamiento. Construimos 10 modelos de homología a partir de nuestro alineamiento empleando el script model\_single.py. Los cinco modelos que alcanzaron un perfil de energía mínimo empleando el script evaluate\_model.py fueron estudiados. Visualizamos y analizamos la estructura de los modelos generados empleando el software VMD (Humphrey *et al.*, 1996).

#### 6) Análisis estadístico.

Se evaluó el ajuste de nuestras series de datos a la distribución Gaussiana mediante tests de Kolmogorov-Smirnov, D'Agostino-Pearson y Shapiro-Wilk. Si nuestros datos se ajustaban a una distribución normal con un valor  $p \leq 0,05$  realizamos

pruebas estadísticas paramétricas. Cuando se compararon sólo dos poblaciones de datos, la evaluación estadística se realizó mediante el test *t* de student de dos colas. Para realizar comparaciones múltiples verificamos no solo si nuestros datos se ajustaban a una distribución normal sino también si presentaban homogeneidad de varianzas mediante un test de Bartlett. Las comparaciones múltiples se realizaron mediante ANOVA de un factor, seguida del Test de Tukey. En los casos donde nuestros datos no se ajustaban a una distribución normal, o no verificaban homogeneidad de varianzas, realizamos pruebas estadísticas no paramétricas. En estos casos, para contrastes simples se empleó la prueba de Mann Whitney y para contrastes múltiples la prueba de Kruskal-Wallis seguida del test contrastes de Dunn. En todos los casos los valores de  $p \leq 0,05$  fueron considerados significativos. Los ajustes de las curvas y los análisis estadísticos se realizaron usando el programa Graph Pad Prism 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

#### 7) Drogas utilizadas.

Las siguientes drogas y sales fueron adquiridas de Sigma-Aldrich (Argentina): ácido ascórbico (ASC), ácido D-iso-ascórbico (D-iso-ASC), ácido dehidroascórbico (DHA), cloruro de acetilcolina (ACh), BAPTA-AM, dimetilsulfóxido (DMSO), ditiotreitól (DTT), ácido ditiobis-nitrobenzoico (DTNB), gentamicina, tricina, HEPES, NaCl, NaOH, CaCl<sub>2</sub>, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, KCl, KOH, MgSO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>. La colagenasa fue adquirida en Worthington Biochem Corp. (Lakewood, NJ, USA). Las soluciones de trabajo de ACh fueron preparadas antes de su uso mediante dilución en solución de Ringer, a partir de alícuotas de soluciones madre de concentración 100 mM conservadas a -20°C. El BAPTA-AM se disolvió en DMSO en una concentración 100 mM y se almacenó en alícuotas a -20°C. Las alícuotas se descongelaron y se diluyeron 1000 veces en solución de Barth en el momento de ser utilizadas. Las soluciones de ASC, D-iso-ASC, DHA y DTT en solución de Ringer se prepararon inmediatamente antes de ser aplicadas. Cuando fue requerido, el pH de estas soluciones se ajustó con NaOH, manteniendo la concentración total de Na<sup>+</sup> en 115 mM (solución de Ringer) para no alterar la fuerza motriz de este ión. Las soluciones de ASC, D-iso-ASC y DHA siempre fueron cubiertas para evitar la exposición a la luz, ya que se degradan ante esto. Todas las soluciones de DTT se prepararon en presencia del quelante de Zn<sup>2+</sup> tricina 10 mM, para evitar la posible interferencia de trazas de iones Zn<sup>2+</sup> (Pan *et al.*, 2000) ya que el

$Zn^{2+}$  bloquea al receptor  $\alpha 9\alpha 10$  y el DTT es un quelante leve *per se* de  $Zn^{2+}$ . El DTNB fue disuelto en DMSO para alcanzar una concentración de 250 mM y luego ser diluido 1000 veces en solución de Ringer para su aplicación.



## Resultados.

### Capítulo 1.

#### Caracterización de los componentes del sitio de unión a ligando del receptor $\alpha 9\alpha 10$ recombinante de rata.

El sitio de unión a ACh de los nAChRs se encuentra en la interfaz formada por los dominios extracelulares de dos subunidades adyacentes. Estas interfaces de unión consisten en un componente principal compuesto por los loops A, B y C, el cual es aportado por una subunidad, y un componente complementario compuesto por los loops D, E, y F, aportado por la subunidad adyacente (Fig. 2).

Los nAChRs musculares requieren la unión de ACh a dos sitios de unión a ligando para su activación (Unwin, 2005). Receptores neuronales heteroméricos, como  $\alpha 4\beta 2$ , pueden involucrar la unión de ACh a un tercer sitio de unión a ligando adicional (Mazzaferro *et al.*, 2011). En cambio, los receptores homoméricos neuronales  $\alpha 7$  pueden activarse ante la unión de ACh a un único sitio de unión (Andersen *et al.*, 2013).

En el receptor muscular, con una estequiometría  $(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$  (adulto) o  $(\alpha 1)_2\beta 1\delta\gamma$  (embrionario), las subunidades  $\alpha 1$  solo aportan componentes principales y las subunidades  $\gamma$ ,  $\delta$  o  $\epsilon$  aportan únicamente complementarios, constituyendo así sus dos interfaces de unión a ACh posibles. El receptor heteromérico neuronal  $\alpha 4\beta 2$  tiene dos estequiometrías posibles,  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$  ó  $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$  (Carbone *et al.*, 2009). En los receptores de estequiometría  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$  las subunidades  $\alpha 4$  aportan los componentes principales y las  $\beta 2$  aportan los complementarios a los dos sitios de unión posibles. Como las subunidades  $\beta$  solo pueden aportar componentes complementarios (con la excepción de la subunidad  $\beta 1$  muscular que no participa en los sitios de unión) esos serían los dos únicos sitios posibles en los receptores de estequiometría  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ . En una estequiometría  $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$  se le agrega a esos dos sitios de unión un tercer sitio constituido por una interfaz  $\alpha 4-\alpha 4$ , ya que la subunidad  $\alpha 4$  puede aportar también componentes complementarios en esta situación (Mazzaferro *et al.*, 2011). Finalmente, en los receptores homoméricos  $\alpha 7$ , la subunidad que los conforma aporta ambos componentes a cinco sitios de unión idénticos (aunque la unión de ACh a solo uno es suficiente para activar este receptor (Andersen *et al.*, 2013)). Estos casos plantean que, las subunidades de tipo  $\alpha$  podrían aportar tanto componentes principales como

complementarios a los sitios de unión, con la excepción de  $\alpha 1$  que solo aporta principales, y que las subunidades de tipo  $\beta$  (excepto  $\beta 1$ ),  $\delta$ ,  $\gamma$  o  $\epsilon$  solo pueden aportar componentes complementarios.

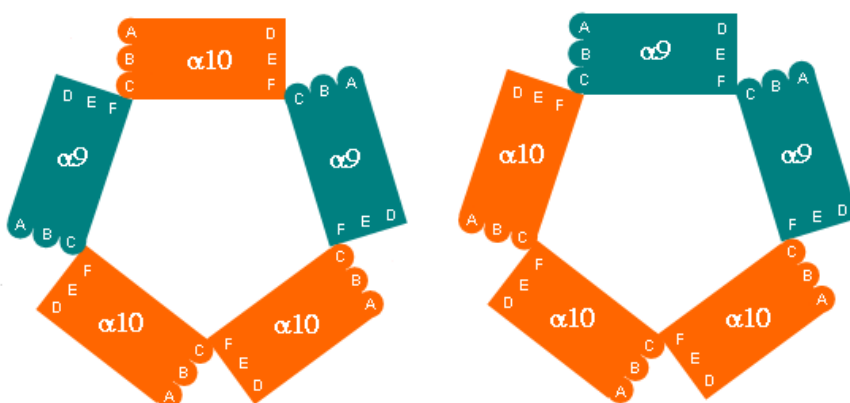
El receptor  $\alpha 9\alpha 10$  es un caso particular, ya que se trata de un receptor heteromérico compuesto solo por subunidades alfa y no por subunidades  $\beta$ . Esto podría sugerir que sería similar a un receptor homomérico como  $\alpha 7$ . Sin embargo, dado que  $\alpha 9\alpha 10$  está formado por dos subunidades  $\alpha$  diferentes entre sí, es posible que algunas de sus combinaciones de componentes principal y complementario no generen sitios equivalentes, como ocurre en el receptor homomérico  $\alpha 7$ .

La expresión de receptores  $\alpha 9$  homoméricos funcionales en oocitos de *X. laevis* (Elgoyhen *et al.*, 1994) confirma que esta subunidad es capaz de aportar tanto componentes principales como complementarios a interfaces de unión a ACh. En contraste, la expresión de subunidades  $\alpha 10$  de rata o humano en sistemas heterólogos no resulta en la formación de receptores funcionales (Elgoyhen *et al.*, 2001; Sgard *et al.*, 2002). En consecuencia, se ha propuesto que  $\alpha 10$  solo podría comportarse como una subunidad “estructural” parecida a las  $\beta$  neuronales que solo aportan componentes complementarios a los sitios de unión (Elgoyhen and Katz, 2012). Es posible que estas diferencias funcionales entre las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  de mamíferos estén relacionadas al proceso de evolución adaptativa que han sufrido las subunidades  $\alpha 10$  de mamíferos, diferenciando su secuencia aminoacídica de las correspondientes a subunidades  $\alpha 9$  (Lipovsek *et al.*, 2012; Lipovsek, 2011).

Sin embargo, la expresión en sistemas heterólogos de subunidades quiméricas con el dominio extracelular de  $\alpha 10$  y los dominios transmembrana e intracelular de  $5HT_{3A}$  resulta en la formación de receptores homoméricos funcionales que responden a ACh y son bloqueados por el antagonista nicotínico competitivo  $\alpha$ -Bungarotoxina (Baker *et al.*, 2004). Más aún, estos receptores quiméricos presentan unión específica de antagonistas nicotínicos como metillicaconitina en ensayos de unión a radioligando (Baker *et al.*, 2004). En conjunto, esto sugiere que los dominios extracelulares de  $\alpha 10$  podrían aportar componentes principales y complementarios a interfaces de unión en esos receptores quiméricos.

Si bien se ha elucidado mediante ensayos de expresión en oocitos de *X. laevis* que la estequiometría del receptor  $\alpha 9\alpha 10$  recombinante de rata es  $(\alpha 9)_2(\alpha 10)_3$  (Plazas *et al.*, 2005b), no se conoce el orden de ensamblaje de las subunidades en el pentámero. Por lo tanto, tampoco se conoce la composición de las cinco posibles interfaces de

unión a ACh. Existirían dos órdenes de ensamblaje posibles, uno alternado ( $\alpha 9\alpha 10\alpha 9\alpha 10\alpha 10$ ) y uno continuo ( $\alpha 9\alpha 9\alpha 10\alpha 10\alpha 10$ , Fig. 8). El orden alternado implica que habría cuatro interfaces heteroméricas  $\alpha 9\alpha 10$  y una homomérica  $\alpha 10\alpha 10$ . El orden continuo involucraría dos interfaces heteroméricas  $\alpha 9\alpha 10$ , dos homoméricas  $\alpha 10\alpha 10$  y una homomérica  $\alpha 9\alpha 9$ . Estas observaciones implican que muy probablemente el funcionamiento del receptor heteromérico dependa de la activación de sitios de unión a ACh que involucren a la subunidad  $\alpha 10$ . Sin embargo, se desconoce si ésta aporta componentes principales o complementarios.



**Figura 8:** Esquemas representativos de los dos órdenes de ensamblaje posibles para el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  con la estequiometría  $(\alpha 9)_2(\alpha 10)_3$ . Se esquematizan las interfaces de unión remarcando los loops A, B y C del componente principal y D, E y F del componente complementario.

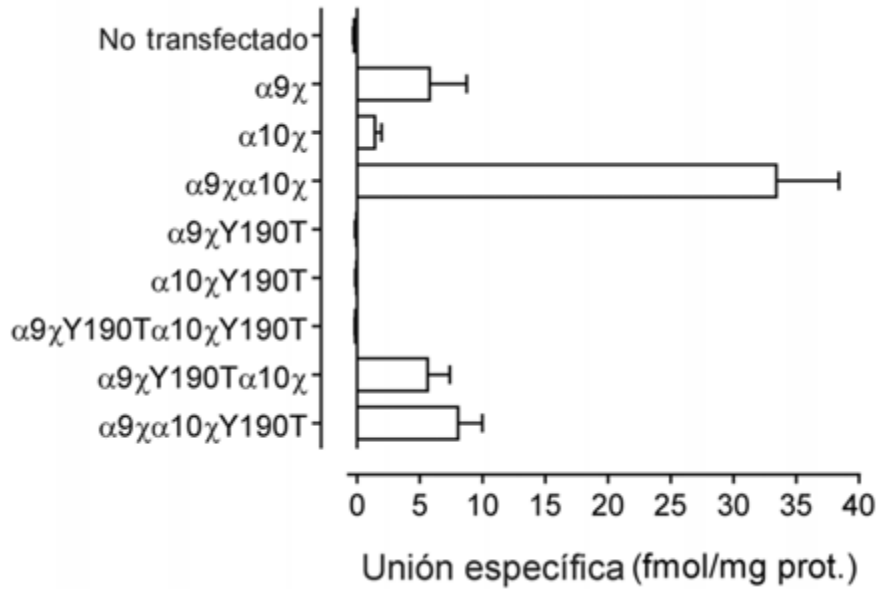
El objetivo de este capítulo es el de estudiar la contribución relativa de los componentes principales y complementarios de las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  a los sitios de unión a ACh del receptor  $\alpha 9\alpha 10$ . Para ello expresamos receptores heteroméricos en los cuales las subunidades  $\alpha 9$  ó  $\alpha 10$  son portadoras de una mutación en su componente principal o complementario que anularía la unión de agonista a los sitios de unión mutados. Luego evaluamos el efecto de la mutación sobre la funcionalidad del receptor. De este modo, al anular alguno de los componentes del sitio de unión, la existencia de cambios en la sensibilidad aparente por la ACh en una curva concentración-respuesta, indicaría que el componente afectado cumpliría un rol relevante en la activación del receptor. Si en cambio la mutación no afecta la sensibilidad a ACh, el componente del sitio de unión que contiene la mutación no sería necesario para el funcionamiento del receptor.

### 1.1) Contribución de las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ a los componentes principales de los sitios de unión a ACh.

Para determinar la importancia de los componentes principales de  $\alpha 9$  ó  $\alpha 10$  en el funcionamiento de  $\alpha 9\alpha 10$ , generamos subunidades mutantes con la sustitución Y190T (numeración de la subunidad  $\alpha 1$  de *T. marmorata*). El residuo Y190 del componente principal está altamente conservado y es un residuo clave en el loop C de las subunidades nicotínicas  $\alpha$  (Karlin, 2002). Este residuo está implicado en estabilizar grupos amonio cuaternario de distintos ligandos (acetilcolina, nicotina, etc.) al sitio de unión (Sine *et al.*, 1994). Adicionalmente, como consecuencia del movimiento del loop C durante la estabilización de la unión de ACh (Gao *et al.*, 2006), se ha reportado que este residuo interfiere con un puente salino asociado al estado cerrado del receptor (Mukhtasimova *et al.*, 2005). Por lo tanto, se ha propuesto que el residuo Y190 estaría involucrado en el inicio de la cascada de cambios estructurales que abren el canal iónico (Mukhtasimova *et al.*, 2005). En conjunto, este residuo participa no solo en la unión de agonista, sino que también en el proceso de “gating”.

Se ha demostrado que en el receptor  $\alpha 7$  la sustitución de este residuo por treonina anula la unión de radioligandos y de ACh al receptor (Raves *et al.*, 2009). Por lo tanto, la sustitución Y190T en  $\alpha 9$  ó  $\alpha 10$  sería adecuada para nuestro propósito de anular los componentes principales en el receptor  $\alpha 9\alpha 10$ . Para corroborar que esta mutación también anula los sitios de unión de  $\alpha 9\alpha 10$  realizamos ensayos de unión a radioligando. Debido a los bajos niveles de unión específica registrados al expresar las subunidades WT (Baker *et al.*, 2004), los ensayos de unión a radioligando fueron llevados a cabo expresando en células tsA201 subunidades quiméricas donde el dominio extracelular de  $\alpha 9$  ó  $\alpha 10$  se fusionó al dominio C-terminal de 5HT<sub>3A</sub> (de ahora en más,  $\alpha 9\chi$  y  $\alpha 10\chi$ ). Ambas subunidades  $\alpha 9\chi$  y  $\alpha 10\chi$  forman receptores homoméricos y heteroméricos que unen agonista y son funcionales al ser expresadas en esa línea celular (Baker *et al.*, 2004; Ballesteros *et al.*, 2005; Plazas *et al.*, 2007; Verbitsky *et al.*, 2003). Una quimera similar con el dominio extracelular de  $\alpha 7$  e intracelular y transmembrana de 5HT<sub>3A</sub> ha sido extensamente utilizada como modelo para estudiar las propiedades del sitio de unión y el “gating” de receptores Cys-loop (Andersen *et al.*, 2011; Bouzat *et al.*, 2008; Raves *et al.*, 2009).

La figura 9 muestra niveles de unión específica de [<sup>3</sup>H]- $\alpha$ -Bungarotoxina, un antagonista competitivo que interactúa con Y190 y otros residuos conservados que también interactúan con ACh en el sitio de unión (Dellisanti *et al.*, 2007). Se ha reportado que las subunidades individuales  $\alpha 9\chi$  o  $\alpha 10\chi$  presentan niveles de unión específica de radioligando detectables pero bajos (Baker *et al.*, 2004; Ballesterero *et al.*, 2005; Plazas *et al.*, 2007). Al co-expresar ambas subunidades la unión específica aumentó  $23 \pm 10$  veces ( $n = 4$ ) con respecto a la expresión de subunidades individuales, lo cual es consistente con lo reportado por Baker *et al.* (2004), quienes sugieren que esto se debe a un aumento en la expresión de receptores en membrana causado por la combinación de ambas subunidades. La expresión de los receptores mutantes homoméricos  $\alpha 9\chi Y190T$  o  $\alpha 10\chi Y190T$ , resultó en niveles de unión específica no detectables, sugiriendo que la mutación Y190T anula los sitios de unión de esos receptores. Como era de esperar, los receptores heteroméricos  $\alpha 9\chi Y190T \alpha 10\chi Y190T$  tampoco presentaron niveles de unión específica detectables. Por otro lado, los receptores heteroméricos  $\alpha 9\chi Y190T \alpha 10\chi$  y  $\alpha 9\chi \alpha 10\chi Y190T$  mostraron niveles de unión específica detectables y similares a los observados para los receptores homoméricos  $\alpha 9\chi$  y  $\alpha 10\chi$  ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido de contrastes de Dunn). Estos niveles de unión fueron  $25 \pm 6$  ( $n = 3$ ) veces menores que el del receptor  $\alpha 9\chi \alpha 10\chi$ , lo cual también concuerda con la diferencia observada entre los niveles de unión específica de receptores quiméricos homoméricos y heteroméricos no mutados ( $23 \pm 10$ ). En su conjunto, estos resultados se corresponden con los reportados para quimeras  $\alpha 7$ -5HT<sub>3A</sub> con la mutación Y190T (Rayes *et al.*, 2009) y corroboran que esta mutación anula los sitios de unión a ACh que involucren componentes principales de  $\alpha 9$  ó  $\alpha 10$  mutantes.

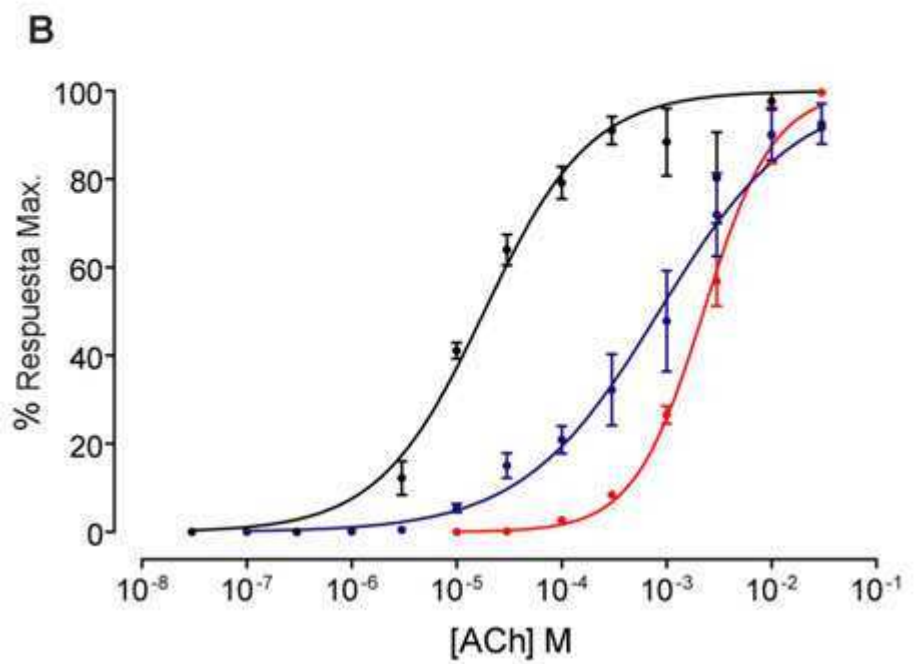
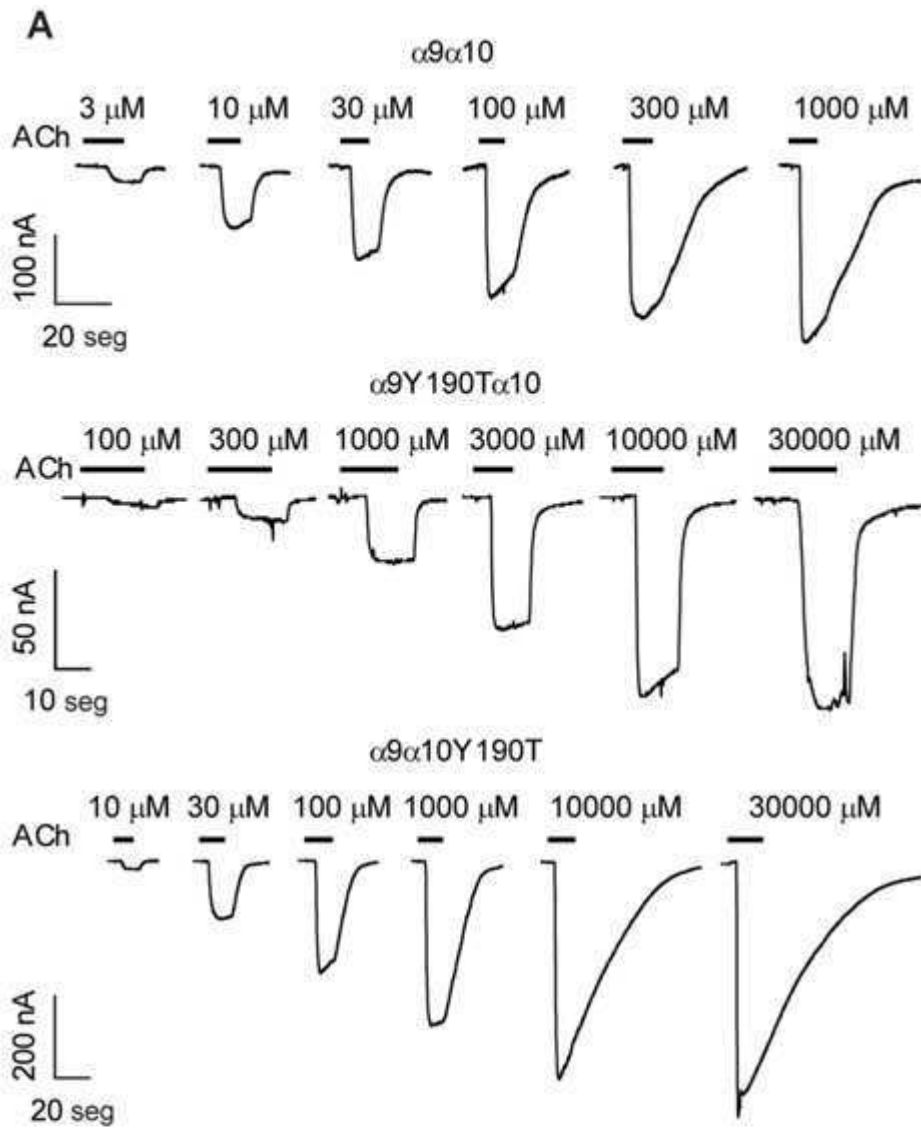


**Figura 9:** Niveles de unión específica de [<sup>3</sup>H]- $\alpha$ -Bungarotoxina a lisados de células tsA201 previamente transfectadas con subunidades  $\alpha 9\chi$  y/o  $\alpha 10\chi$  WT o portadoras de la mutación Y190T. Se graficó la media y el error estándar de 3 repeticiones por grupo.

La figura 10A muestra trazos representativos de las corrientes evocadas por concentraciones crecientes de ACh en oocitos de *X. laevis* que expresan receptores  $\alpha 9\alpha 10$  de rata WT o mutados con la sustitución Y190T en la subunidad  $\alpha 9$  ó  $\alpha 10$ . Las amplitudes de las corrientes máximas evocadas ( $I_{m\acute{a}x}$ ) de receptores  $\alpha 9 Y 190 T \alpha 10$  fueron significativamente menores que las WT ( $I_{m\acute{a}x}$ : WT =  $298 \pm 48$  nA;  $\alpha 9 Y 190 T \alpha 10$  =  $112 \pm 6$  nA;  $p = 0,0072$  t-student,  $n = 5-8$ ; Tabla 6). Sin embargo, como la subunidad  $\alpha 10$  no forma receptores homoméricos funcionales (Elgoyhen *et al.*, 2001; Sgard *et al.*, 2002), y como las  $I_{m\acute{a}x}$  de un receptor  $\alpha 9$  homomérico son  $\sim 20$  veces menores que las del receptor  $\alpha 9\alpha 10$  salvaje (Elgoyhen *et al.*, 2001), estos resultados indican que la subunidad  $\alpha 9 Y 190 T$  se ensambla con  $\alpha 10$  para formar pentámeros heteroméricos funcionales. Por otro lado, las  $I_{m\acute{a}x}$  de  $\alpha 9\alpha 10 Y 190 T$  no fueron significativamente diferentes de las del receptor WT ( $I_{m\acute{a}x}$ : WT =  $298 \pm 48$  nA;  $\alpha 9\alpha 10 Y 190 T$  =  $336 \pm 91$  nA;  $p = 0,6922$  t-student,  $n = 6-8$ ; Tabla 6). Dado que, como ya mencionamos, las  $I_{m\acute{a}x}$  del receptor  $\alpha 9$  homomérico son mucho menores que las del receptor  $\alpha 9\alpha 10$  salvaje, este resultado sugiere que la subunidad  $\alpha 10 Y 190 T$  también se incorpora al pentámero dando receptores heteroméricos funcionales. No se observaron corrientes en oocitos inyectados con ambas subunidades mutadas ante la aplicación de ACh 1 mM o 30 mM

(n = 8), en concordancia con la falta de unión de [<sup>3</sup>H]- $\alpha$ -Bungarotoxina a receptores quiméricos con ambas subunidades mutantes.

Como se muestra en la figura 10B, la sustitución Y190T en  $\alpha$ 9 ó  $\alpha$ 10 produjo un corrimiento de la curva concentración-respuesta a ACh hacia la derecha, generando un aumento de la EC<sub>50</sub> de al rededor de dos órdenes de magnitud (EC<sub>50</sub>: WT = 18 ± 3  $\mu$ M;  $\alpha$ 9Y190T $\alpha$ 10 = 2254 ± 155  $\mu$ M;  $\alpha$ 9 $\alpha$ 10Y190T = 850 ± 170  $\mu$ M; p < 0,0001 t-student, n = 5-8; Tabla 6). Estos resultados, en conjunto con los de unión a radioligando (Fig. 9), sugieren que tanto  $\alpha$ 9 como  $\alpha$ 10 contribuyen con componentes principales a los sitios de unión a ACh del receptor  $\alpha$ 9 $\alpha$ 10 y que ambos componentes principales son necesarios para el funcionamiento normal del receptor.





**Figura 10:** A) Trazos representativos de las respuestas evocadas por concentraciones crecientes de ACh en oocitos que expresan receptores WT (panel superior),  $\alpha 9\gamma 190T\alpha 10$  (panel central) o  $\alpha 9\alpha 10\gamma 190T$  (panel inferior). Para cada receptor, los trazos expuestos fueron registrados en un mismo oocito, realizando lavados de 3 min con solución de Ringer entre aplicaciones. B) Curvas concentración-respuesta para ACh construidas en oocitos que expresan receptores WT (curva negra),  $\alpha 9\gamma 190T\alpha 10$  (curva roja) o  $\alpha 9\alpha 10\gamma 190T$  (curva azul). Los valores de amplitud de corriente máxima de las respuestas fueron normalizados a los valores registrados a ACh 30 mM. Se graficó la media y el error estándar de 5 a 8 repeticiones por punto.

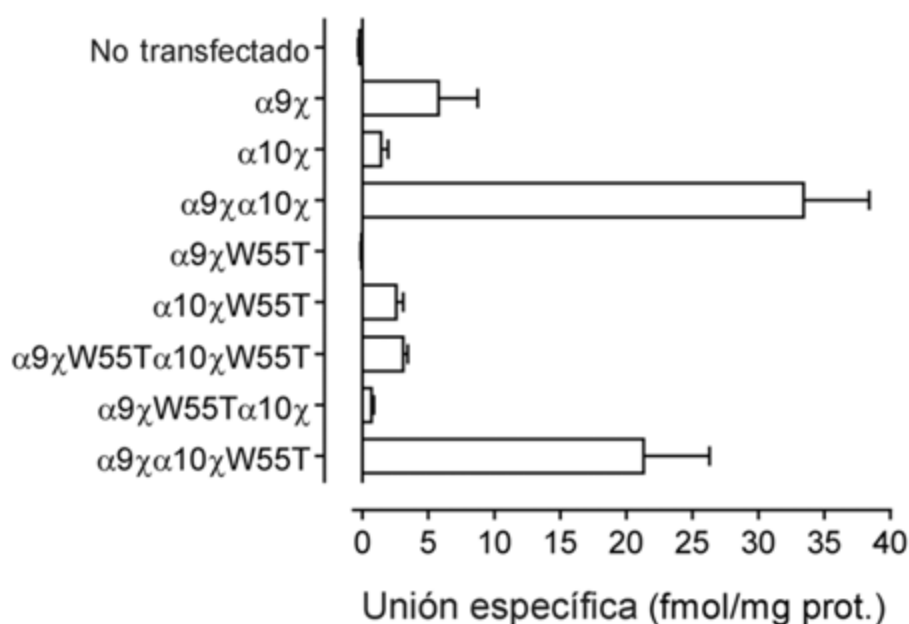
1.2) Contribución de las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  a los componentes complementarios de los sitios de unión a ACh.

Existen pocos residuos conservados en el componente complementario de los nAChRs. El W55 es el único residuo altamente conservado en los componentes complementarios de las subunidades que aportan estos componentes a sitios de unión (subunidades  $\alpha$  excepto  $\alpha 1$ ,  $\beta$  excepto  $\beta 1$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$ ). Este es un residuo clave en el loop D (Karlin, 2002) que está relacionado con la afinidad y la potencia de la unión de ligandos al receptor (Corringer *et al.*, 1995) y su farmacología (Xie and Cohen, 2001). Más aún, la sustitución W55T anula los sitios de unión para ACh del receptor  $\alpha 7$  (Rayes *et al.*, 2009). Esto se ha evidenciado en experimentos de unión a [ $^3$ H]- $\alpha$ -Bungarotoxina y desplazamiento de ese radioligando con ACh no marcada. La  $\alpha$ -Bungarotoxina es un antagonista competitivo que no interactúa con el W55 en el receptor del órgano eléctrico de Torpedo o en el receptor homomérico  $\alpha 7$  (Rayes *et al.*, 2009; Xie and Cohen, 2001). Con lo cual, la mutación W55T no anula la unión de ese radioligando a los sitios de unión mutados. Sin embargo la ACh no marcada no puede desplazar la marca de [ $^3$ H]- $\alpha$ -Bungarotoxina en ensayos de unión, evidenciando que esta mutación anula la unión de ACh a receptores  $\alpha 7W55T$  (Rayes *et al.*, 2009). La mutación W55T también puede alterar la cinética de eventos de canal único (Akk, 2002) y la desensibilización de corrientes macroscópicas evocadas (Gay *et al.*, 2008) de los nAChRs.

La figura 11 muestra los niveles de unión específica de [ $^3$ H]- $\alpha$ -Bungarotoxina en receptores formados por las subunidades  $\alpha 9\chi$  y/o  $\alpha 10\chi$ , con o sin la mutación W55T. A diferencia de lo reportado para el receptor del órgano eléctrico de Torpedo (Xie and Cohen, 2001) y el receptor homomérico  $\alpha 7$  (Rayes *et al.*, 2009), en receptores homoméricos  $\alpha 9\chi W55T$  no detectamos unión específica del radioligando. Este resultado

indica que la mutación W55T en los componentes complementarios de  $\alpha 9$  anula la unión del antagonista competitivo y muy probablemente también la del agonista. Por otro lado, los receptores homoméricos  $\alpha 10\chi W55T$  presentaron niveles de unión específica que no fueron significativamente diferentes de los observados con receptores  $\alpha 10\chi$  ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido de contrastes de Dunn).

En consistencia con haber anulado los sitios de unión a agonista en receptores  $\alpha 9\chi W55T$ , pero no en receptores  $\alpha 10\chi W55T$ , los receptores heteroméricos  $\alpha 9\chi W55T\alpha 10\chi$  y  $\alpha 9\chi W55T\alpha 10\chi W55T$  generaron niveles de unión específica de [ $^3H$ ]- $\alpha$ -Bungarotoxina que no fueron significativamente diferentes de los observados con receptores homoméricos  $\alpha 10\chi$  y  $\alpha 10\chi W55T$  ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido de contrastes de Dunn). En contraste, los receptores  $\alpha 9\chi\alpha 10\chi W55T$  mostraron niveles de unión específica similares a los observados con receptores quiméricos no mutantes  $\alpha 9\chi\alpha 10\chi$  ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis seguido de contrastes de Dunn).

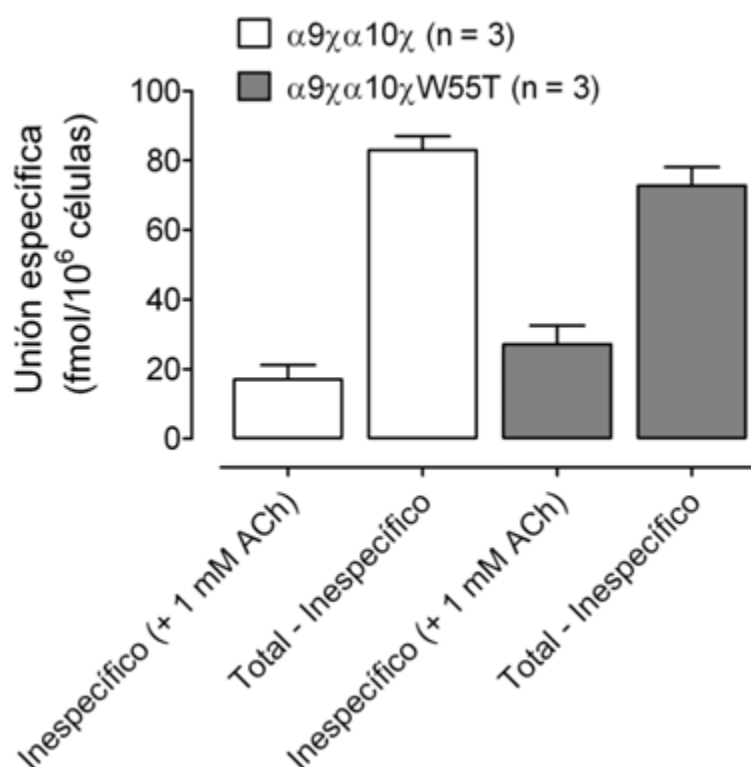


**Figura 11:** Niveles de unión específica de [ $^3H$ ]- $\alpha$ -Bungarotoxina a lisados de células tsA201 previamente transfectadas con subunidades  $\alpha 9\chi$  y/o  $\alpha 10\chi$  WT o portadoras de la mutación W55T. Se graficó la media y el error estándar de 3 repeticiones por grupo.

Los resultados obtenidos con el receptor  $\alpha 9\chi\alpha 10\chi W55T$  demuestran que la mutación W55T en  $\alpha 10$  no modifica la unión de [ $^3H$ ]- $\alpha$ -Bungarotoxina al receptor. Sin embargo esto no descarta que la mutación W55T en  $\alpha 10$  anule la unión de ACh a los

sitios de unión que la contengan. Si este fuese el caso, la afinidad por ACh del receptor se vería afectada y la marca de [<sup>3</sup>H]- $\alpha$ -Bungarotoxina no se desplazaría por ACh no marcada, como ha sido descrito en receptores  $\alpha 7\text{W}55\text{T}$  (Rayes *et al.*, 2009). Con el fin de analizar esta posibilidad, realizamos experimentos de desplazamiento de [<sup>3</sup>H]- $\alpha$ -Bungarotoxina con exceso de ACh no marcada (1 mM) en receptores  $\alpha 9\chi\alpha 10\chi\text{W}55\text{T}$ .

La figura 12 muestra niveles de unión específica a [<sup>3</sup>H]- $\alpha$ -Bungarotoxina, en presencia o ausencia de ACh no marcada 1 mM. Los receptores  $\alpha 9\chi\alpha 10\chi\text{W}55\text{T}$  produjeron niveles de unión específica (desplazable por ACh) no significativamente distintos que los receptores quiméricos no mutados ( $p = 0,2$  Mann Whitney). Este resultado sugiere que la mutación W55T en los componentes complementarios de  $\alpha 10$  no afecta extensivamente la interacción de ACh con el sitio de unión. Esto es diferente a lo reportado al realizar la sustitución W55T en  $\alpha 7$  (Rayes *et al.*, 2009).



**Figura 12:** Niveles de unión específica de [<sup>3</sup>H]- $\alpha$ -Bungarotoxina determinado por la adición de ACh 1 mM no marcada a lisados de células tsA201 que expresan receptores  $\alpha 9\chi\alpha 10\chi$  o  $\alpha 9\chi\alpha 10\chi\text{W}55\text{T}$ . Se graficó la media y el error estándar de 3 repeticiones por grupo.

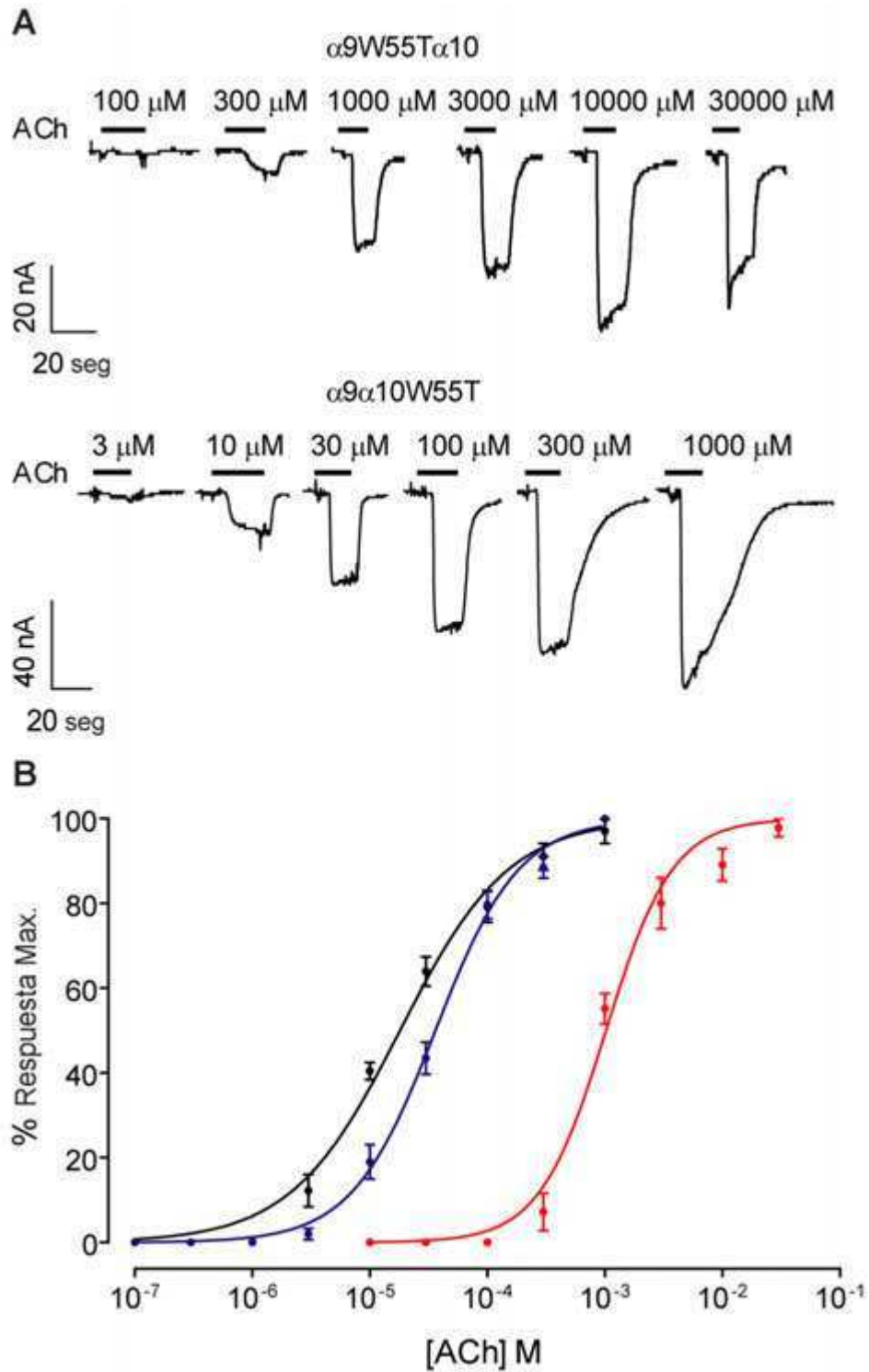
La figura 13A muestra trazos representativos de corrientes evocadas ante la aplicación de concentraciones crecientes de ACh en oocitos que expresan receptores

$\alpha 9\alpha 10$  WT o con la mutación W55T en  $\alpha 9$  ó  $\alpha 10$ . Los receptores con ambas subunidades mutadas no evocaron corrientes ante la aplicación de ACh 1 mM ó 30 mM ( $n = 15$ ). Los receptores  $\alpha 9W55T\alpha 10$  presentaron  $I_{m\acute{a}x}$  que fueron de amplitudes significativamente menores a las de receptores WT, mientras que las  $I_{m\acute{a}x}$  de receptores  $\alpha 9\alpha 10W55T$  no fueron significativamente diferentes de las WT ( $I_{m\acute{a}x}$ : WT =  $298 \pm 48$  nA;  $\alpha 9W55T\alpha 10 = 42 \pm 4$  nA,  $p = 0,0009$  t-student;  $\alpha 9\alpha 10W55T = 177 \pm 81$  nA,  $p = 0,1826$  t-student;  $n = 5-8$ ; Tabla 6).

Como se muestra en la figura 13B, la sustitución W55T en  $\alpha 9$  produjo un aumento de dos órdenes de magnitud en la  $EC_{50}$  de ACh ( $EC_{50}$ : WT =  $18 \pm 3$   $\mu$ M;  $\alpha 9W55T\alpha 10 = 1022 \pm 35$   $\mu$ M,  $p < 0,0001$  t-student;  $n = 5-8$ ; Tabla 6). Este resultado sugiere que en ausencia de componentes complementarios de  $\alpha 9$  la funcionalidad del receptor heteromérico se encuentra comprometida y por lo tanto los sitios de unión a ACh que involucran componentes complementarios de  $\alpha 9$  son necesarios y no pueden ser reemplazados por los de  $\alpha 10$ . Por otro lado, la figura 13B también muestra que la sustitución W55T en  $\alpha 10$  produjo un pequeño, aunque significativo, incremento en la  $EC_{50}$  de ACh ( $EC_{50}$ : WT =  $18 \pm 3$   $\mu$ M;  $\alpha 9\alpha 10W55T = 36 \pm 1$   $\mu$ M,  $p = 0,0003$  t-student;  $n = 6-8$ ; Tabla 6), sugiriendo que a pesar de estar mutado el W55 en los componentes complementarios de  $\alpha 10$ , la funcionalidad del receptor está muy poco afectada.

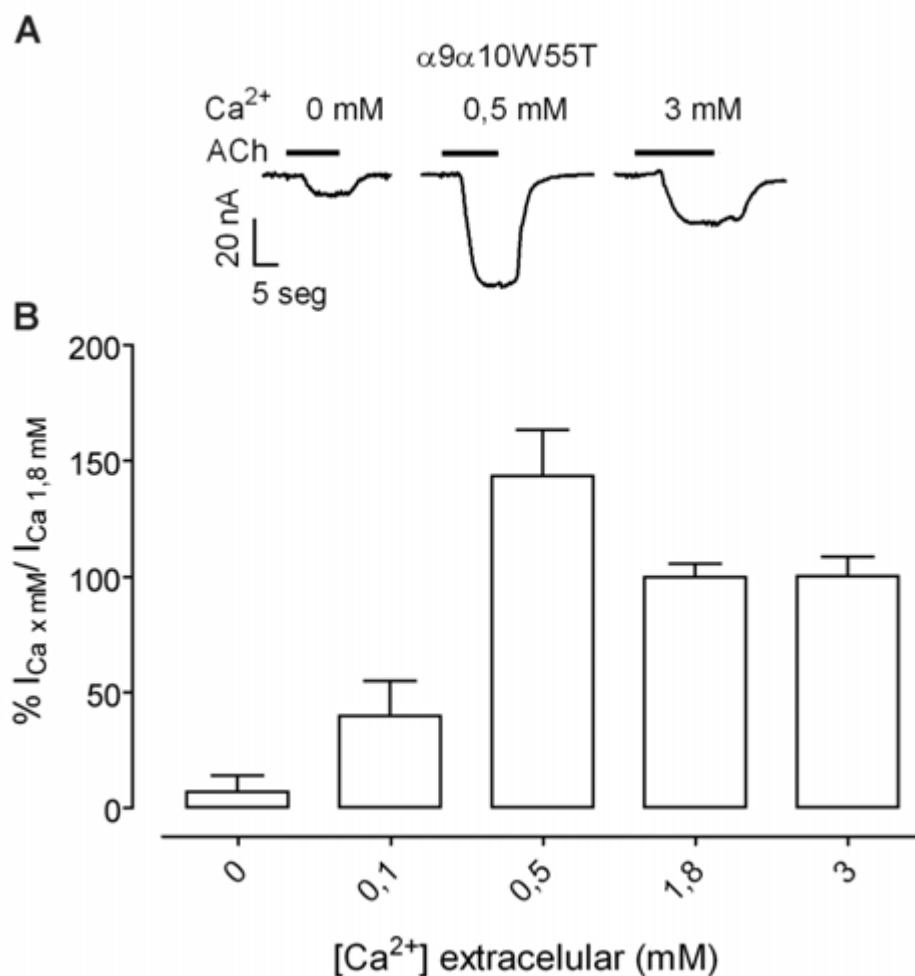
Es posible que la subunidad mutante  $\alpha 10W55T$  no se ensamble con  $\alpha 9$  y que las respuestas a ACh observadas al co-expresar  $\alpha 10W55T$  y  $\alpha 9$  se deban a la formación de receptores  $\alpha 9$  homoméricos, los cuales tienen una  $EC_{50}$  de ACh similar a la de  $\alpha 9\alpha 10$  (Elgoyhen *et al.*, 1994; Elgoyhen *et al.*, 2001). Sin embargo, las  $I_{m\acute{a}x}$  de receptores  $\alpha 9\alpha 10W55T$  no fueron significativamente diferentes de las del receptor heteromérico WT ( $I_{m\acute{a}x}$ : WT =  $298 \pm 48$  nA;  $\alpha 9\alpha 10W55T = 177 \pm 81$  nA,  $p = 0,1826$  t-student;  $n = 6-8$ ; Tabla 6). Como las  $I_{m\acute{a}x}$  del receptor  $\alpha 9$  homomérico son  $\sim 20$  veces menores que las del receptor  $\alpha 9\alpha 10$  salvaje (Elgoyhen *et al.*, 2001), esto sugiere que la subunidad  $\alpha 10W55T$  se incorpora al pentámero dando receptores heteroméricos funcionales. Más aún, para corroborar que la subunidad  $\alpha 10W55T$  se incorpore al pentámero, evaluamos el perfil de modulación por  $Ca^{2+}$  extracelular de los receptores  $\alpha 9\alpha 10W55T$ . Los receptores homoméricos  $\alpha 9$  son solo bloqueados por el  $Ca^{2+}$  extracelular, mientras que  $\alpha 9\alpha 10$  es potenciado a concentraciones sub mM y bloqueado a concentraciones más elevadas (Katz *et al.*, 2000; Weisstaub *et al.*, 2002). Este cambio en el perfil de modulación es causado por la incorporación de  $\alpha 10$  al pentámero (ver Capítulo 2). En consecuencia, si las subunidades  $\alpha 10W55T$  son incorporadas a pentámeros para formar

receptores heteroméricos  $\alpha 9\alpha 10W55T$ , observaríamos la potenciación por  $Ca^{2+}$  extracelular a concentraciones sub mM. Por otro lado, si este no fuera el caso, obtendríamos una típica curva de inhibición en respuesta a concentraciones crecientes de  $Ca^{2+}$  extracelular. La figura 14A muestra las respuestas evocadas por una concentración de ACh cercana a la  $EC_{50}$  (30  $\mu M$ ) al co-aplicar concentraciones crecientes de  $Ca^{2+}$  extracelular. La figura 14B muestra el perfil de modulación obtenido a ACh 30  $\mu M$  al co-aplicar concentraciones crecientes de  $Ca^{2+}$  extracelular. Normalizamos las amplitudes máximas de corriente en cada concentración de  $Ca^{2+}$  a las correspondientes a  $Ca^{2+}$  1,8 mM en cada experimento. Un ANOVA de un factor seguido de comparaciones múltiples indicó que la diferencia entre las corrientes a  $Ca^{2+}$  0 mM (nominal, ya que nuestras soluciones pueden contener trazas de  $Ca^{2+}$ ) y 0,5 mM es significativa ( $p = 0,019$ ; Kruskal Wallis seguido de contrastes de Dunn). Este resultado indica que las respuestas son potenciadas por  $Ca^{2+}$  y que por ende las subunidades  $\alpha 10W55T$  se incorporan al pentámero para formar receptores heteroméricos  $\alpha 9\alpha 10W55T$ .



**Figura 13:** A) Trazos representativos de las respuestas evocadas por concentraciones crecientes de ACh en oocitos que expresan receptores  $\alpha 9W55T\alpha 10$  (panel superior) o  $\alpha 9\alpha 10W55T$  (panel inferior). Para cada receptor, los trazos expuestos fueron registrados en un mismo oocito, realizando lavados de 3 min con solución de Ringer entre aplicaciones. B) Curvas concentración-respuesta a ACh construidas en oocitos que expresan receptores WT (curva negra),  $\alpha 9W55T\alpha 10$  (curva roja) y  $\alpha 9\alpha 10W55T$  (curva azul). Los valores de amplitud de corriente máxima de las respuestas fueron normalizados a los valores

registrados a ACh 1 mM (WT y  $\alpha 9\alpha 10W55T$ ) ó 30 mM ( $\alpha 9W55T\alpha 10$ ). Se graficó la media y el error estándar de 5 a 8 repeticiones por punto.



**Figura 14:** A) Trazos representativos de las respuestas evocadas por ACh 30  $\mu$ M en oocitos que expresan receptores  $\alpha 9\alpha 10W55T$  a diferentes concentraciones de  $Ca^{2+}$  extracelular. Los trazos expuestos fueron registrados en un mismo oocito, realizando lavados de 3 min con solución de Ringer entre aplicaciones. B) Gráfico de barras representando el perfil de modulación por  $Ca^{2+}$  extracelular del receptor  $\alpha 9\alpha 10W55T$ . Las amplitudes de corriente máximas de las respuestas obtenidas a diferentes concentraciones extracelulares de  $Ca^{2+}$  se normalizaron al valor registrado a  $Ca^{2+}$  1,8 mM en el mismo oocito. Se graficó la media y el error estándar de 3 repeticiones por grupo.

Se ha descrito que el residuo W55 del componente complementario es fundamental para el funcionamiento de los nAChRs (Akk, 2002; Corringer *et al.*, 1995; Gay *et al.*, 2008; Rayes *et al.*, 2009; Xie and Cohen, 2001) y que la mutación W55T en  $\alpha 7$  anula el sitio de unión de ACh (Rayes *et al.*, 2009). Nuestros resultados de experimentos de unión a radioligando y de respuestas funcionales a ACh indican que el

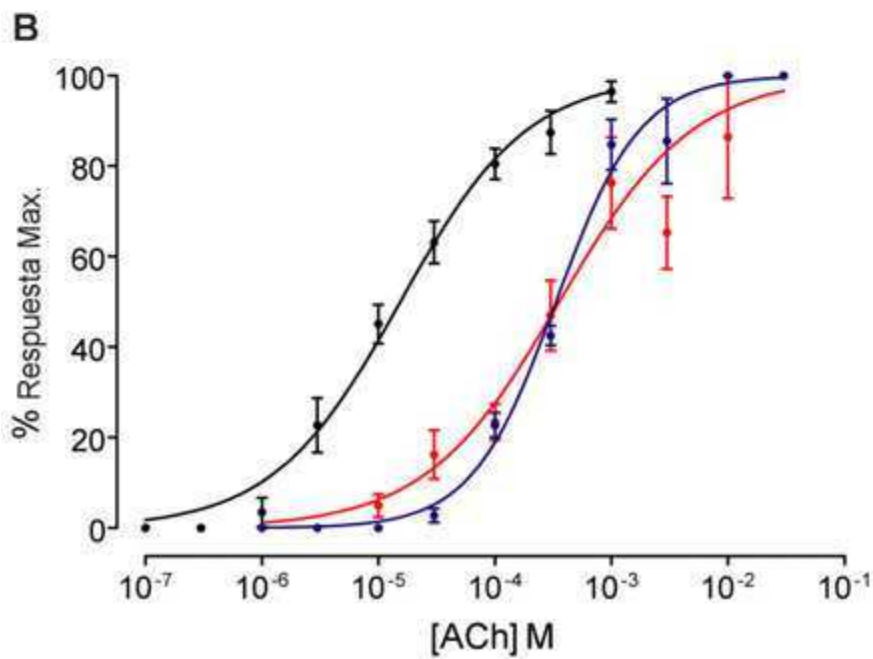
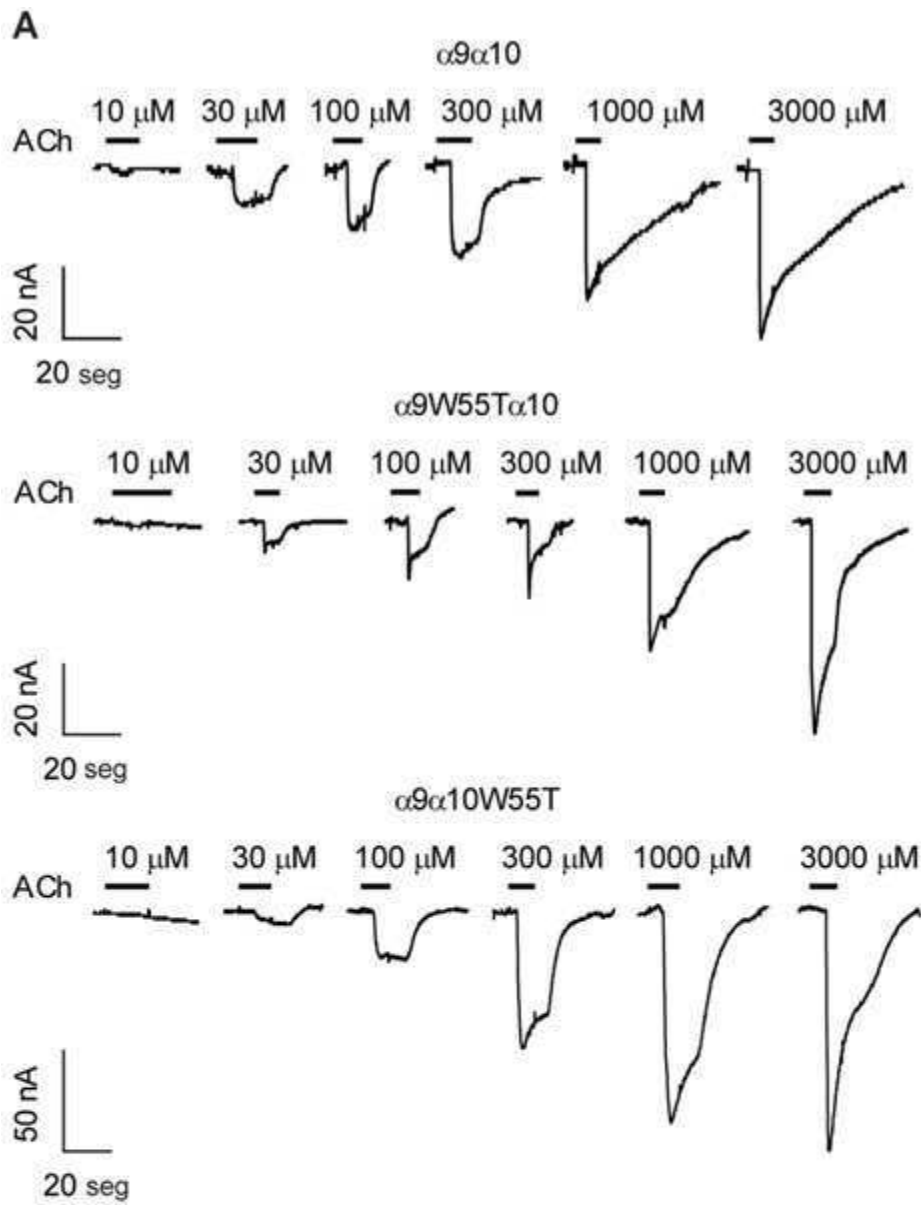
componente complementario de  $\alpha 9$  es fundamental para el normal funcionamiento del receptor. Por el contrario, y a diferencia de lo observado para otros receptores y para  $\alpha 9$ , en el caso de  $\alpha 10$  la sustitución W55T no anuló la unión de ACh y casi no afectó las respuestas funcionales a ACh. Esto podría indicar que, en el caso del receptor  $\alpha 9\alpha 10$  de rata, los W55 de subunidades  $\alpha 10$  no son fundamentales para el correcto funcionamiento del receptor. Esta asimetría entre las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  podría deberse al proceso de evolución adaptativa que han sufrido solamente las subunidades  $\alpha 10$  de mamíferos, diferenciando su secuencia primaria de la de las subunidades  $\alpha 10$  de vertebrados no mamíferos y de  $\alpha 9$  (Lipovsek *et al.*, 2012; Lipovsek, 2011). Más aún, existe evidencia sugiriendo que, como consecuencia de este proceso de evolución adaptativa, se acumularon sustituciones no sinónimas en residuos aledaños al W55 en el loop D de la subunidad  $\alpha 10$  de mamíferos (Lipovsek, 2011). Por lo tanto, si esos cambios acumulados durante el proceso de evolución adaptativa de  $\alpha 10$  afectan la función del W55, la contribución de los W55 de  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  al funcionamiento de un receptor  $\alpha 9\alpha 10$  de un vertebrado no mamífero debería ser similar. Para poner a prueba esa hipótesis, estudiamos el efecto de la mutación W55T en receptores de pollo.

La figura 15A muestra respuestas representativas a concentraciones crecientes de ACh evocadas en oocitos que expresan receptores de pollo  $\alpha 9\alpha 10$  WT o con la sustitución W55T en  $\alpha 9$  ó  $\alpha 10$ . Los receptores con ambas subunidades mutadas no evocaron respuestas a ACh 1 mM ó 30 mM ( $n = 10$ ). El receptor  $\alpha 9W55T\alpha 10$  de pollo presentó una  $I_{m\acute{a}x}$  que fue de amplitud significativamente menor a las de los receptores WT, mientras que la del receptor  $\alpha 9\alpha 10W55T$  fue similar a la WT ( $I_{m\acute{a}x}$ : WT =  $100 \pm 12$  nA;  $\alpha 9W55T\alpha 10 = 59 \pm 8$  nA,  $p = 0,0205$  t-student;  $\alpha 9\alpha 10W55T = 159 \pm 32$  nA,  $p = 0,1137$  t-student;  $n = 6$ ; Tabla 6). A diferencia de lo observado en receptores  $\alpha 9\alpha 10$  de rata, como se muestra en la figura 15B, en el caso del pollo la sustitución W55T produjo un corrimiento significativo hacia la derecha de las curvas concentración-respuesta a ACh de igual magnitud al estar presente en  $\alpha 9$  ó  $\alpha 10$  ( $EC_{50}$ : WT =  $16 \pm 2$   $\mu$ M;  $\alpha 9W55T\alpha 10 = 357 \pm 75$   $\mu$ M;  $\alpha 9\alpha 10W55T = 334 \pm 13$   $\mu$ M;  $p < 0,0011$  t-student;  $n = 6$ ; Tabla 6).



Receptor	$I_{\text{máx}}$ (nA)	P	$EC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	p	Hill	p	n	$R^2$
Rata $\alpha 9\alpha 10$	298 $\pm$ 48		18 $\pm$ 3		0,9 $\pm$ 0,1		8	0,9701
$\alpha 9Y190T\alpha 10$	112 $\pm$ 6	0,0072*	2254 $\pm$ 155	<0,0001*	1,3 $\pm$ 0,1	0,0206*	5	0,9749
$\alpha 9\alpha 10Y190T$	336 $\pm$ 91	0,6922	850 $\pm$ 170	<0,0001*	0,6 $\pm$ 0,1	0,0599	6	0,8852
$\alpha 9W55T\alpha 10$	42 $\pm$ 4	0,0009*	1022 $\pm$ 35	<0,0001*	1,5 $\pm$ 0,2	0,0196*	5	0,9628
$\alpha 9\alpha 10W55T$	177 $\pm$ 81	0,1826	36 $\pm$ 1	0,0003*	1,2 $\pm$ 0,1	0,0599	6	0,9696
Pollo $\alpha 9\alpha 10$	100 $\pm$ 12		16 $\pm$ 2		0,8 $\pm$ 0,1		6	0,9274
$\alpha 9W55T\alpha 10$	59 $\pm$ 8	0,0205*	357 $\pm$ 75	0,0011*	0,7 $\pm$ 0,1	0,4956	6	0,8345
$\alpha 9\alpha 10W55T$	159 $\pm$ 32	0,1137	334 $\pm$ 13	<0,0001*	1,2 $\pm$ 0,1	0,0179*	6	0,9424

**Tabla 6:** Corrientes máximas evocadas y parámetros de las curvas concentración-respuesta. Los valores p reportados corresponden a pruebas *t* de Student contrastando contra los valores obtenidos para el receptor WT correspondiente.



**Figura 15:** A) Trazos representativos de las respuestas evocadas por concentraciones crecientes de ACh en oocitos que expresan receptores de pollo WT (panel superior),  $\alpha 9W55T\alpha 10$  (panel central) o  $\alpha 9\alpha 10W55T$  (panel inferior). Para cada receptor, los trazos expuestos fueron registrados en un mismo oocito, realizando lavados de 3 min con solución de Ringer entre aplicaciones. B) Curvas concentración-respuesta para ACh construidas en oocitos que expresan receptores de pollo WT (curva negra),  $\alpha 9W55T\alpha 10$  (curva roja) o  $\alpha 9\alpha 10W55T$  (curva azul). Los valores de amplitud de corriente máxima de las respuestas fueron normalizados a los valores registrados a ACh 1 mM (WT) ó 30 mM ( $\alpha 9W55T\alpha 10$  y  $\alpha 9\alpha 10W55T$ ). Se graficó la media y el error estándar de 6 a 8 repeticiones por punto.

### 1.3) Discusión.

En este capítulo evidenciamos que los componentes principales del sitio de unión a ACh aportados por las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  son ambos necesarios para el funcionamiento del receptor  $\alpha 9\alpha 10$ . Adicionalmente, demostramos que los componentes complementarios de  $\alpha 9$  son indispensables para la activación del receptor.

Los componentes principales del sitio de unión a ACh son fundamentales para la unión del agonista y para iniciar la cascada de cambios estructurales que culminan con la abertura del poro (Gay and Yakel, 2007). Concretamente, el loop C del componente principal se mueve 11Å y se “cierra” sobre la molécula de agonista unida, produciendo el cambio estructural más significativo en el sitio de unión, el cual se propone que inicia el proceso de “gating” (Gao *et al.*, 2006; Hansen *et al.*, 2005). El residuo Y190 en el componente principal, estudiado en este trabajo, está muy conservado y es característico del loop C (Karlin, 2002). Particularmente, ante el movimiento del loop C, la Y190 interrumpe un puente salino entre los tramos  $\beta 7$  y  $\beta 10$ , contribuyendo así a los cambios estructurales mencionados (Mukhtasimova *et al.*, 2005). Más aún, la mutación Y190T anula la unión de radioligandos a los sitios de unión de  $\alpha 7$  (Rayes *et al.*, 2009), lo que pudimos corroborar expresando subunidades  $\alpha 9Y190T$  y  $\alpha 10Y190T$  y realizando ensayos de unión a radioligando.

Nuestros experimentos empleando receptores con las sustituciones Y190T en las subunidades  $\alpha 9$  sugieren que los componentes principales de esta subunidad son indispensables para el correcto funcionamiento del receptor  $\alpha 9\alpha 10$ . Esto es consistente con la formación de receptores homoméricos  $\alpha 9$  funcionales ya reportada (Elgoyhen *et al.*, 1994), donde los únicos componentes principales posibles para los sitios de unión a ACh son aportados por esa subunidad. Por otro lado, nuestros resultados también

implican que la subunidad  $\alpha 10$  de rata, a pesar de no formar canales homoméricos funcionales (Elgoyhen *et al.*, 2001; Sgard *et al.*, 2002), participa de la unión de agonista y esta unión está acoplada al “gating” del canal en el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  heteromérico, ya que mutar sus componentes principales afecta en forma marcada la sensibilidad del receptor a ACh. Por otro lado, nuestros resultados con la sustitución Y190T en  $\alpha 10$  implican que la función de solo los componentes principales de  $\alpha 9$  no es suficiente para sustentar el funcionamiento normal del receptor heteromérico. Más aún, los experimentos con subunidades  $\alpha 9$  con la mutación Y190T demuestran que tampoco lo serían los principales de  $\alpha 10$  *per se*. Por lo tanto, podemos concluir que tanto los componentes principales de  $\alpha 9$  como los de  $\alpha 10$  son necesarios para la activación del receptor heteromérico. En consecuencia, la subunidad  $\alpha 10$  no es una subunidad meramente “estructural”, como había sido descrita originalmente (Elgoyhen and Katz, 2012), ya que sus componentes principales son clave para el funcionamiento del receptor heteromérico.

Los experimentos de unión de [ $^3$ H]- $\alpha$ -Bungarotoxina a receptores  $\alpha 9\chi$ Y190T $\alpha 10\chi$  y  $\alpha 9\chi\alpha 10\chi$ Y190T mostraron niveles de unión específica similares a los de los receptores homoméricos  $\alpha 9\chi$  ó  $\alpha 10\chi$ , lo que podría implicar que las subunidades mutantes no se incorporan a pentámeros para formar receptores heteroméricos. Sin embargo, al expresar subunidades  $\alpha 9$ Y190T o  $\alpha 10$ Y190T en oocitos, junto con  $\alpha 10$  ó  $\alpha 9$  respectivamente, obtuvimos receptores cuya sensibilidad a ACh es muy diferente a la reportada para receptores  $\alpha 9$  homoméricos o  $\alpha 9\alpha 10$ . Esto sugiere que las subunidades  $\alpha 9$ Y190T y  $\alpha 10$ Y190T se integran al pentámero para formar parte de los receptores heteroméricos.

Por otro lado, en este capítulo también evidenciamos que los componentes complementarios del sitio de unión a ACh aportados por las subunidades  $\alpha 9$  son indispensables para el funcionamiento normal del receptor  $\alpha 9\alpha 10$ . Para estudiar la relevancia de los componentes complementarios aportados por cada subunidad en el receptor  $\alpha 9\alpha 10$ , construimos subunidades mutadas en el residuo W55. El W55 es el único residuo en el componente complementario que está conservado entre las subunidades capaces de aportar componentes complementarios, es decir  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\beta$  y  $\alpha$  (Karlin, 2002). Las subunidades  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  son excepciones a esto, ya que no presentan componentes complementarios del sitio de unión a ACh. Este residuo está ubicado en el loop D del componente complementario, el cual participa en el proceso de “gating” interactuando con el loop C adyacente y formando un puente de hidrógeno que

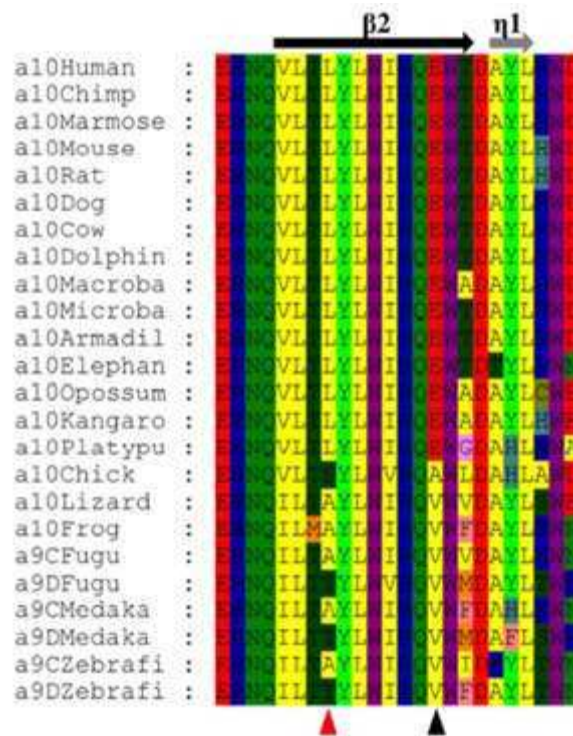
estabiliza el estado “cerrado” del loop C (Gleitsman *et al.*, 2008). El W55 también influencia la unión de agonista (Corringer *et al.*, 1995) y las propiedades cinéticas de los nAChRs (Akk, 2002; Gay *et al.*, 2008). Más aún, la mutación W55T anula la unión de ACh a los sitios de unión de  $\alpha 7$  (Rayes *et al.*, 2009), por lo que empleamos esta mutación para estudiar la relevancia de los componentes complementarios de las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$ .

Los ensayos de unión de radioligando que involucraron receptores con la sustitución W55T en  $\alpha 9$  mostraron que esa mutación en  $\alpha 9$  anula la unión de  $\alpha$ -Bungarotoxina, un antagonista competitivo que no interactúa con el W55. Este resultado es diferente al efecto reportado para esta mutación en el receptor  $\alpha 7$  homomérico (Rayes *et al.*, 2009) y del órgano eléctrico de Torpedo (Xie and Cohen, 2001). La  $\alpha$ -Bungarotoxina interactúa con la mayoría de los residuos del componente principal con los que interactúa la ACh (Dellisanti *et al.*, 2007). En consecuencia, este resultado sugiere que como la  $\alpha$ -Bungarotoxina no puede unirse a receptores con la sustitución W55T en  $\alpha 9$ , la unión de ACh a esos sitios de unión mutantes también estaría anulada. Consistentemente con esta interpretación, los experimentos de respuestas funcionales que involucraron receptores  $\alpha 9W55T\alpha 10$  demuestran que esta sustitución en los complementarios de  $\alpha 9$  afecta en forma marcada la sensibilidad a ACh del receptor heteromérico. Por otro lado, esos resultados también implican que la funcionalidad de solamente los componentes complementarios de  $\alpha 10$  en un receptor pentamérico (no alterados en los receptores  $\alpha 9W55T\alpha 10$ ), no es suficiente para sustentar el funcionamiento normal del receptor. Por lo tanto, en conjunto estos resultados demuestran que los componentes complementarios de  $\alpha 9$  son indispensables para el correcto funcionamiento del receptor.

Los resultados empleando subunidades  $\alpha 10$  con la mutación W55T demuestran que esta sustitución en  $\alpha 10$  no altera la unión de radioligando, ni su desplazamiento por ACh no marcada. Esto es consistente con el escaso efecto que esta mutación en  $\alpha 10$  tuvo sobre la sensibilidad a ACh de receptores  $\alpha 9\alpha 10$ , como se observa en los experimentos de respuestas funcionales. En consecuencia, al no haber afectado los componentes complementarios de  $\alpha 10$  con la mutación W55T, no podemos concluir acerca de su relevancia en el funcionamiento del receptor heteromérico. Experimentos futuros en los que se analizará el efecto de diferentes sustituciones en el componente complementario de  $\alpha 10$  permitirán elucidar este punto.

Sin embargo, es llamativo que la mutación W55T en  $\alpha 10$  no haya anulado la unión de ACh, dado que se ha reportado que esta mutación en  $\alpha 7$  anula el sitio de unión de ACh (Raves *et al.*, 2009), como así también lo hace en  $\alpha 9$ . Como ya se ha mencionado, el W55 del componente complementario es fundamental para el funcionamiento de los nAChRs (Akk, 2002; Corringer *et al.*, 1995; Gay *et al.*, 2008; Raves *et al.*, 2009; Xie and Cohen, 2001). Es interesante destacar que el W55 no solo interactúa con la ACh para estabilizarla en el sitio de unión (Corringer *et al.*, 1995; Raves *et al.*, 2009; Xie and Cohen, 2001), sino que también está involucrado en varios otros procesos funcionales. Particularmente, este residuo está involucrado en el proceso de “gating”, dado que influencia la probabilidad de apertura de los nAChRs (Akk, 2002) y la cinética de desensibilización (Gay *et al.*, 2008). La falta de un efecto marcado de la mutación W55T en  $\alpha 10$  sobre la unión de ACh y la  $EC_{50}$  del receptor  $\alpha 9\alpha 10$  indica que, en el contexto estructural de los componentes complementarios de  $\alpha 10$ , el residuo W55 no estaría involucrado extensamente en la unión de ACh ni en los cambios estructurales que afectan el proceso de “gating”.

Esta asimetría entre el efecto de la mutación W55T en los componentes complementarios de las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  podría deberse al proceso de evolución adaptativa que han sufrido solamente las subunidades  $\alpha 10$  de mamíferos (Lipovsek *et al.*, 2012; Lipovsek, 2011). Dado que la mutación W55T en receptores  $\alpha 9\alpha 10$  de pollo tuvo un efecto similar al estar presente en las subunidades  $\alpha 9$  ó  $\alpha 10$ , nuestros resultados sustentan esta hipótesis. Esto sugiere que sustituciones no sinónimas en la secuencia de  $\alpha 10$  de mamíferos, posiblemente en el loop D, acumulados a lo largo de su historia evolutiva serían responsables de que el efecto de la mutación W55T no sea marcado en  $\alpha 10$ , cuando sí lo es al estar en  $\alpha 9$ . Existe evidencia de sustituciones no sinónimas en residuos aledaños al W55 en el loop D de la subunidad  $\alpha 10$  de mamíferos en consecuencia a este proceso de evolución adaptativa (Lipovsek, 2011). Particularmente, ocurrió un cambio de un residuo neutro/polar por uno hidrofóbico en posición 52 (S/T/A por L, numeración de  $\alpha 1$  de Torpedo) y de un residuo hidrofóbico por uno cargado negativamente en posición 59 en el linaje de mamíferos (V por E, Fig. 16). Ambos cambios son marcados en cuanto a las propiedades de los residuos sustituidos y son muy cercanos al W55. Esto puede representar un contexto estructural diferente para el W55 en las subunidades  $\alpha 10$  de mamíferos y posiblemente justifique las diferencias observadas con la mutación W55T en el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  de rata.



**Figura 16:** Alineamiento de secuencias aminoacídicas de  $\alpha 10$  de vertebrados. Las secuencias se alinearon empleando Clustal W. Los residuos con propiedades similares se representan en el mismo color. El tramo  $\beta 2$ , donde se encuentra el loop D se representa en la parte superior del alineamiento. Las puntas de flecha debajo del alineamiento indican sitios para los cuales se predice que están bajo selección positiva en el linaje de mamíferos, identificados por un análisis de *branch-site*. Punta de flecha negra:  $p > 0.75$ ; punta de flecha roja:  $p > 0.95$ . Adaptado de (Lipovsek, 2011).

En conjunto nuestros resultados implican que, aunque el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  está formado solo por subunidades  $\alpha$ , las interfaces de unión de  $\alpha 9\alpha 10$  no son equivalentes, ya que el W55 en los componentes complementarios de cada subunidad tendría una relevancia diferente. Por lo tanto, el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  se comportaría como un receptor heteromérico en cuanto a sus sitios de unión. Recientemente se ha reportado que el receptor  $\alpha 7$  homomérico puede activarse ante la unión de ACh a uno solo de sus sitios de unión (Andersen *et al.*, 2013). En consecuencia, sería interesante en el futuro estudiar si el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  podría ser activado por la unión de ACh a uno solo de los sitios posibles y cuáles de ellos, al ser no equivalentes, inducirían más efectivamente la apertura del poro.

## Capítulo 2.

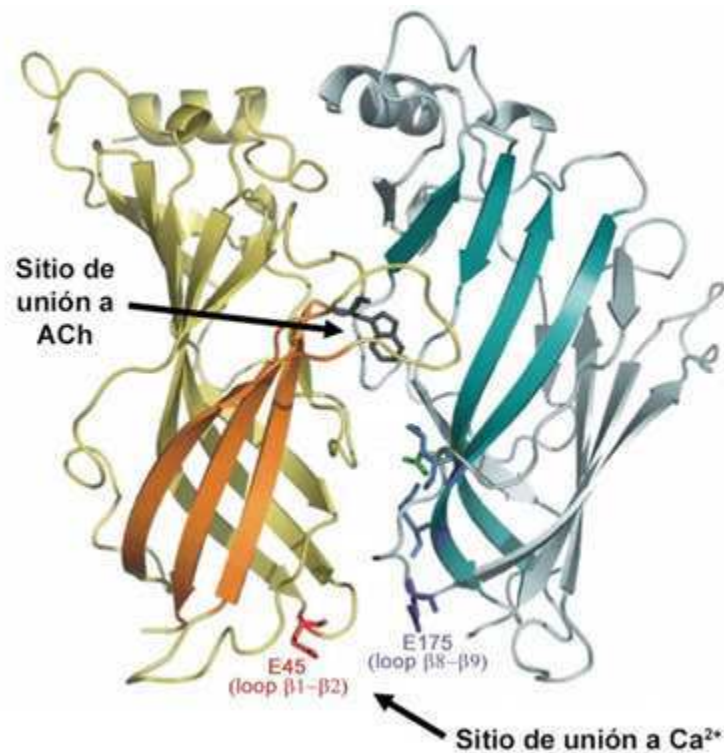
### Determinantes moleculares de la dependencia del $\text{Ca}^{2+}$ extracelular del receptor nicotínico $\alpha 9\alpha 10$ recombinante de rata.

Como ya se detalló en apartados anteriores, la activación del receptor  $\alpha 9\alpha 10$  de las células ciliadas de la cóclea puede reducir el trauma acústico (Maison *et al.*, 2002; Taranda *et al.*, 2009). Con el objetivo de estudiar las condiciones en las cuales el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  alcanza la máxima activación posible, caracterizamos la modulación por el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular del receptor de rata expresado en oocitos de *X. laevis*. El  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular puede potenciar las respuestas macroscópicas de varios subtipos de nAChRs neuronales (Amador and Dani, 1995; Bonfante-Cabarcas *et al.*, 1996; Buisson *et al.*, 1996; Galzi *et al.*, 1996; Liu and Berg, 1999; Mulle *et al.*, 1992b; Vernino *et al.*, 1992) y bloquear las de los musculares (Grassi and Degasperi, 2000) y  $\alpha 9$  homoméricos (Katz *et al.*, 2000). Algunos receptores como  $\alpha 7$ ,  $\alpha 4\beta 2$  ó  $\alpha 9\alpha 10$  pueden ser simultáneamente potenciados y bloqueados por el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Buisson *et al.*, 1996; Liu and Berg, 1999; Weisstaub *et al.*, 2002). La potenciación se evidencia a concentraciones sub-milimolares a milimolares y el bloqueo a concentraciones mayores (Buisson *et al.*, 1996; Liu and Berg, 1999; Weisstaub *et al.*, 2002). La relevancia fisiológica de la modulación por  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular se ha demostrado muy claramente para los receptores  $\alpha 4\beta 2$ , ya que pacientes con epilepsia de lóbulo frontal nocturna autosómica dominante (ADNFLE, por su sigla en inglés) presentan mutaciones en este receptor que reducen su sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Rodrigues-Pinguet *et al.*, 2003).

La potenciación por  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular fue caracterizada con mayor profundidad en el receptor neuronal  $\alpha 7$ , para el cual se ha propuesto un sitio de unión en el dominio extracelular N-terminal. Mutaciones en el glutamato en posición 45 (numeración de la subunidad  $\alpha 1$  de *T. marmorata*) reduce la potenciación y en el E175 prácticamente la anula (Galzi *et al.*, 1996). Estos dos residuos con carga negativa conforman el sitio de unión propuesto para el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Este sitio estaría ubicado entre el loop  $\beta 1$ - $\beta 2$ , el cual contiene al E45, y el loop  $\beta 8$ - $\beta 9$  de la subunidad adyacente en el pentámero, el cual contiene al E175 (Fig. 17)(Le Novere *et al.*, 2002). La ubicación del E175 es interesante ya que se encuentra en el lumen del vestíbulo del canal, adyacente a la parte



superior del dominio transmembrana (Eddins *et al.*, 2002a; Eddins *et al.*, 2002b) que forma el poro del canal, con lo cual, solo acceden a ese sitio cationes permeantes.



**Figura 17:** Esquema de los dominios extracelulares de dos subunidades nicotínicas adyacentes. Se detalla la posición del sitio de unión a ACh y del sitio propuesto de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  conformado por los residuos E45 del loop  $\beta 1$ - $\beta 2$  y E175 del loop  $\beta 8$ - $\beta 9$ . Adaptado de (McLaughlin *et al.*, 2009).

El mecanismo propuesto para la potenciación consiste en que el  $\text{Ca}^{2+}$ , al unirse a su sitio de unión, generaría un cambio conformacional que involucra el tramo  $\beta 9$ , el cual también participa en los cambios conformacionales causados por la unión del agonista (Lyford *et al.*, 2003). Este cambio conformacional favorecería la transición del estado de reposo al estado activado del receptor (McLaughlin *et al.*, 2009; McLaughlin *et al.*, 2006) y por lo tanto sería un mecanismo de tipo alostérico de potenciación.

Por otro lado el bloqueo que produce el  $\text{Ca}^{2+}$  sobre las respuestas de varios nAChRs y particularmente de  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  es dependiente de voltaje (Katz *et al.*, 2000; Mulle *et al.*, 1992a; Weisstaub *et al.*, 2002). Este hecho sugiere que el sitio de interacción del ión está dentro del campo eléctrico de la membrana, probablemente en el poro del canal (Woodhull, 1973). Sin embargo, como el canal es permeable a  $\text{Ca}^{2+}$  el bloqueo nunca es total a potenciales muy hiperpolarizados, ya que el  $\text{Ca}^{2+}$  bloqueante se

disocia de su sitio de unión para pasar a través del poro. De este modo el  $\text{Ca}^{2+}$  al interactuar con ese sitio y disociarse, ocuparía durante más tiempo el poro del receptor y competiría con los cationes monovalentes permeantes por el pasaje a través del poro (Decker and Dani, 1990; Imoto *et al.*, 1988).

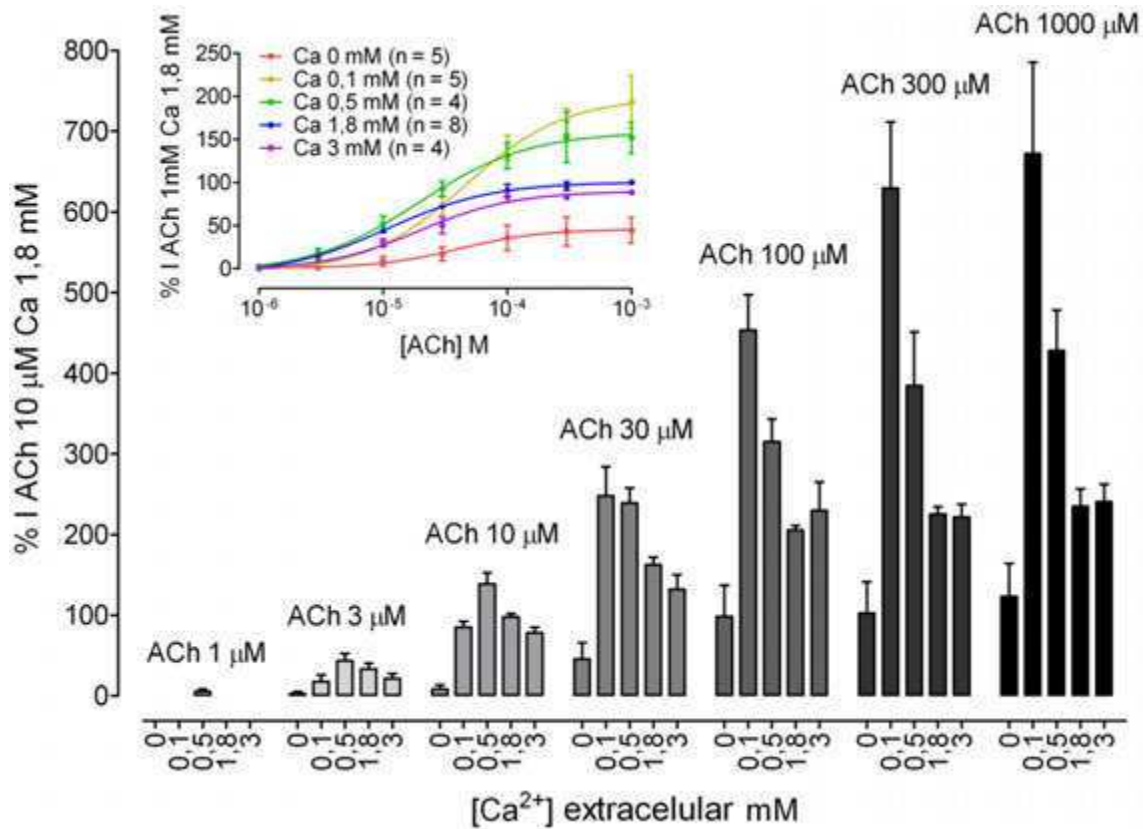
En el cobayo, los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en el fluido circundante a la región basolateral de las células ciliadas del órgano de Corti, la perilinfa, presenta un gradiente desde 1,3 mM en la scala timpánica hasta 0,6 mM en la scala vestibular (Salt and Thalmann, 1988). Más aún, se han observado grandes variaciones en las concentraciones extracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  en varias regiones del cerebro y en la retina como consecuencia de la actividad sináptica (Benninger *et al.*, 1980; Livsey *et al.*, 1990; Pumain and Heinemann, 1985). En la corteza cerebral, por ejemplo, la aplicación de glutamato conlleva una disminución del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular de 1,3 mM a 0,2 mM, debida a, principalmente, su entrada a través de canales (Pumain *et al.*, 1987). Es posible entonces que la actividad de la sinapsis eferente de las células ciliadas cocleares genere cambios dinámicos en el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, dado que su actividad involucra una gran variedad de canales permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  (Zorrilla de San Martín *et al.*, 2010).

Si bien el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  de las células ciliadas de la cóclea está sujeto tanto a potenciación como a bloqueo por  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Gomez-Casati *et al.*, 2005), el receptor homomérico  $\alpha 9$  solo es bloqueado por este catión (Katz *et al.*, 2000). Por lo tanto, este último alcanzaría su máxima activación a concentraciones traza de  $\text{Ca}^{2+}$ . En cambio, el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  necesitaría unir  $\text{Ca}^{2+}$  para alcanzar su máxima activación. Esta diferente modulación por  $\text{Ca}^{2+}$  de los receptores  $\alpha 9$  homomérico y  $\alpha 9\alpha 10$  heteromérico sugiere que la incorporación de la subunidad  $\alpha 10$  al pentámero provee al receptor heteromérico de determinantes estructurales necesarios para la potenciación.

Dada la dependencia de  $\alpha 9\alpha 10$  del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular para alcanzar una activación máxima, sería útil caracterizar el sitio responsable de esta dependencia para diseñar drogas que se unan a él y posiblemente potencien las respuestas del receptor. Conocer ese sitio permitiría modelarlo y realizar ensayos de “docking” *in silico* para diseñar drogas potencialmente útiles para prevenir la pérdida de audición por trauma acústico. En esta sección se analizarán diferentes sitios en las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  y su relación con la modulación por  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$ .

2.1) Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular sobre la  $I_{\text{máx}}$  del receptor  $\alpha 9\alpha 10$  recombinante de rata.

Para estudiar el rol de determinados sitios de las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  en la modulación por  $\text{Ca}^{2+}$  del receptor heteromérico, construimos perfiles de modulación en los cuales cuantificamos la amplitud de corriente a una concentración fija de ACh y concentraciones crecientes de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Estos perfiles varían dependiendo de la concentración de ACh empleada para construirlos. La figura 18 muestra los perfiles de modulación ante cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular que obtuvimos empleando diferentes concentraciones de ACh en oocitos que expresan receptores  $\alpha 9\alpha 10$  WT de rata. Estos resultados evidencian que la concentración de ACh que se utilice para estudiar esta modulación no es trivial, ya que dependiendo de la posición en la curva de concentración-respuesta para ACh en la que nos situemos, los perfiles que se generan son distintos. Notablemente, a medida que aumentamos la concentración de ACh, la amplitud de la respuesta a  $\text{Ca}^{2+}$  0 mM nominal es mayor y el máximo de activación se mueve hacia concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  menores.

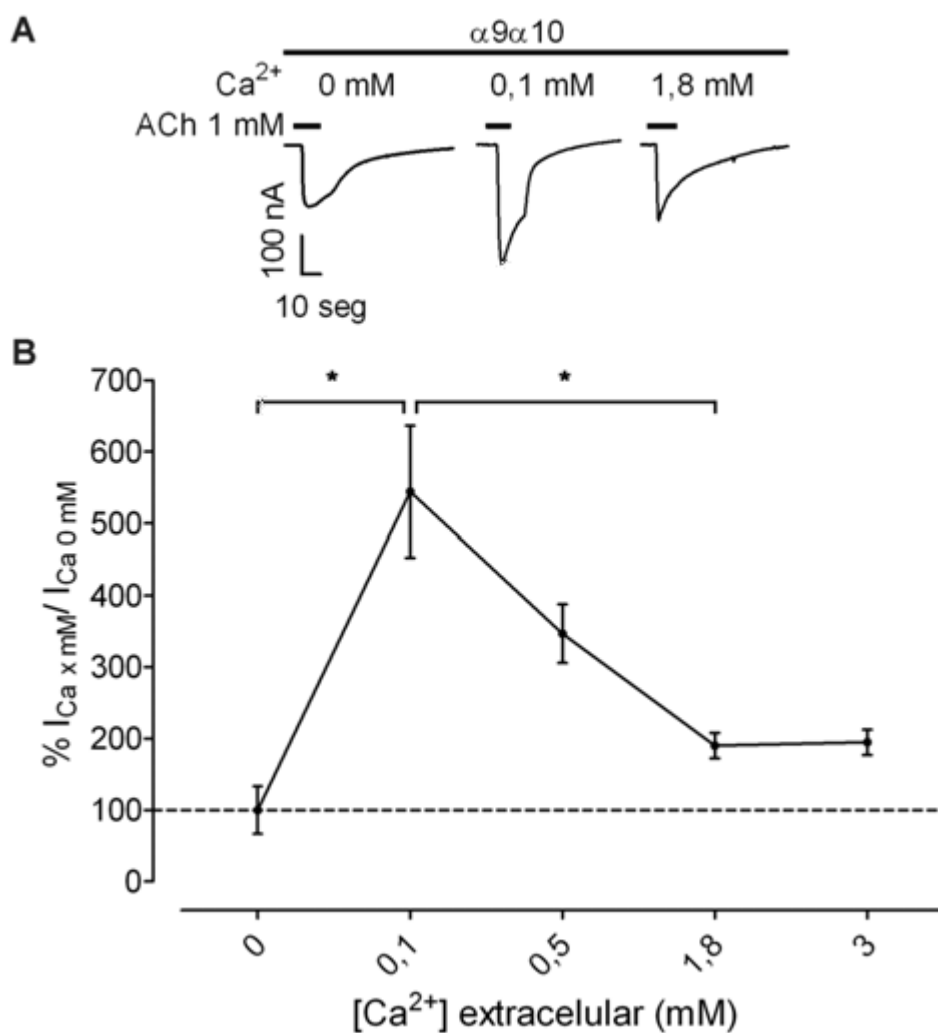


**Figura 18:** Gráfico de barras que representa el perfil de modulación por  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular del receptor  $\alpha 9\alpha 10$  a diferentes concentraciones de ACh. Para cada concentración de ACh, las amplitudes de corriente máximas de las respuestas obtenidas a diferentes concentraciones extracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  se normalizaron al valor registrado a  $\text{Ca}^{2+}$  1,8 mM en el mismo oocito. Se graficó la media y el error estándar de 4 a 8

repeticiones por grupo. Inserto: Curvas concentración-respuesta para ACh construidas a diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular en oocitos que expresan receptores  $\alpha 9\alpha 10$  WT. Los valores de amplitud de corriente máxima de las respuestas fueron normalizados a los valores registrados a ACh 1 mM a la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  del buffer Ringer normal (1,8 mM). Se graficó la media y el error estándar de 4 a 8 repeticiones por punto.

Para identificar determinantes estructurales responsables de la modulación por  $\text{Ca}^{2+}$  del receptor  $\alpha 9\alpha 10$  construimos subunidades mutantes o quiméricas. Como las mutaciones o las quimeras pueden producir *per se* corrimientos en la  $\text{EC}_{50}$  del receptor, decidimos evaluar la modulación por  $\text{Ca}^{2+}$  a concentraciones saturantes de ACh (1 mM), para descartar la influencia de esos corrimientos en nuestros resultados. Por ejemplo, si decidiésemos estudiar la modulación a ACh 10  $\mu\text{M}$  ( $\text{EC}_{50}$  del receptor WT a  $\text{Ca}^{2+}$  1,8 mM) y comparásemos el receptor WT con uno mutante o quimérico con una  $\text{EC}_{50}$  de 300  $\mu\text{M}$ , es probable que a ACh 10  $\mu\text{M}$  el receptor modificado difícilmente evoque corrientes. Si en cambio el receptor mutante o quimérico tuviese una  $\text{EC}_{50}$  de 1  $\mu\text{M}$ , a ACh 10  $\mu\text{M}$  posiblemente se encuentre cerca de estar saturado, con lo cual su perfil de modulación correspondería a un estado de activación del receptor diferente al que evaluamos para el receptor WT (cercano a la  $\text{EC}_{50}$ ). Por lo tanto, en ninguno de los dos casos podríamos compararlos ya que los cambios en los perfiles de modulación observados no estarían influenciados únicamente por la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  sino que también por la diferente posición de la curva concentración-respuesta para ACh en la que los evaluamos. En contraste, una concentración saturante de ACh que evoca la  $\text{I}_{\text{máx}}$  a diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  nos informa acerca del efecto de las mutaciones o quimeras en la modulación por  $\text{Ca}^{2+}$  sin estos inconvenientes.

La figura 19A muestra trazos representativos de las respuestas evocadas por una concentración saturante (1 mM) de ACh (Elgoyhen *et al.*, 2001) en oocitos que expresan el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  de rata a diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Normalizamos las respuestas registradas a una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  0 mM nominal (nuestras soluciones pueden incluir trazas de  $\text{Ca}^{2+}$ ), donde tanto la potenciación como el bloqueo son mínimos, y graficamos el perfil de modulación (Fig. 19B). Las  $\text{I}_{\text{máx}}$  a una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  0,1 mM, fueron potenciadas un  $444 \pm 125$  % relativo a  $\text{Ca}^{2+}$  0 mM ( $n = 5$ ). Concentraciones mayores bloquearon la  $\text{I}_{\text{máx}}$  llegando a una meseta a  $\text{Ca}^{2+}$  1,8 mM (%  $\text{I}_{\text{máx } 0 \text{ mM}}$ : Ca 1,8 mM =  $90 \pm 18$  %,  $n = 5$ ; Ca 3 mM =  $95 \pm 18$  %,  $n = 4$ ).

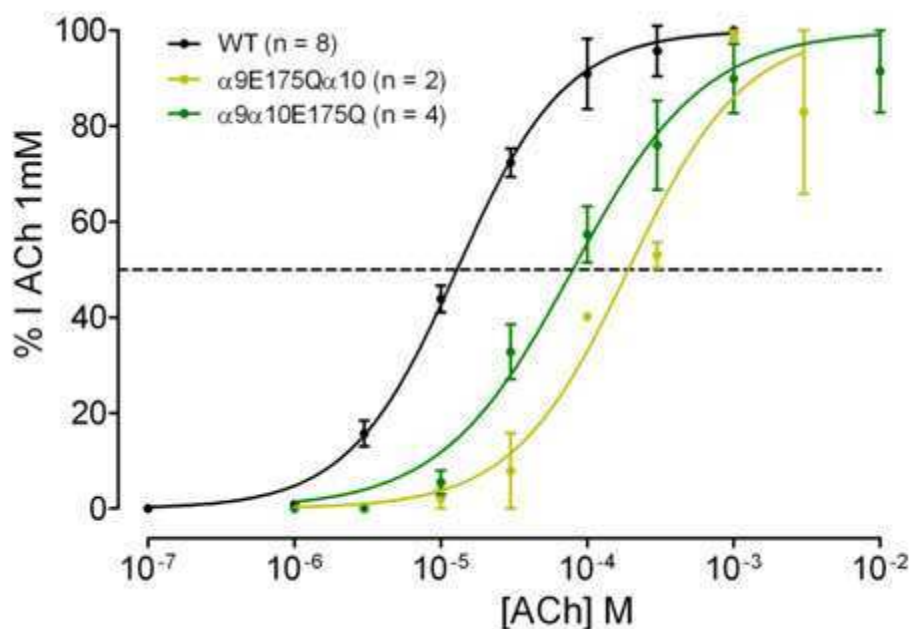


**Figura 19:** A) Trazos representativos de las respuestas evocadas por ACh 1 mM en oocitos que expresan receptores  $\alpha 9\alpha 10$ . Los trazos expuestos fueron registrados en un mismo oocito, realizando lavados de 3 min con solución de Ringer luego de cada aplicación y preincubando 2 min con cada concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  antes de su co-aplicación con ACh. B) Perfiles de modulación por  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular de los receptores  $\alpha 9\alpha 10$  WT. Las amplitudes de corriente máximas de las respuestas obtenidas a diferentes concentraciones extracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  se normalizaron al valor registrado a  $\text{Ca}^{2+}$  0 mM en el mismo oocito. Se graficó la media y el error estándar de 4 a 6 repeticiones por grupo; \* = significativamente diferentes entre sí,  $p < 0,05$  Mann Whitney.

## 2.2) Rol de los residuos E175 de $\alpha 9$ y $\alpha 10$ en la modulación por $\text{Ca}^{2+}$ .

Para determinar si el sitio propuesto de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  constituido por el E45 y el E175 (Fig. 17) se encuentra conservado en  $\alpha 9\alpha 10$ , construimos subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  con la mutación E175Q. Se ha evidenciado que esta mutación anula la potenciación por  $\text{Ca}^{2+}$  en el receptor  $\alpha 7$  de pollo (Galzi *et al.*, 1996). Por lo tanto, esta mutación sería

apropiada para evaluar si el residuo E175 está involucrado en la modulación por  $\text{Ca}^{2+}$  del receptor  $\alpha 9\alpha 10$ . La figura 20 muestra curvas concentración-respuesta para ACh a  $\text{Ca}^{2+}$  1,8 mM (concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  del buffer Ringer normal) construidas en oocitos que expresan receptores  $\alpha 9\alpha 10$  con la mutación E175Q en sus subunidades  $\alpha 9$  ó  $\alpha 10$ . Los receptores mutantes presentaron corrimientos de las curvas concentración-respuesta hacia la derecha y, en consecuencia, valores de  $\text{EC}_{50}$  significativamente mayores que los del receptor WT ( $\text{EC}_{50}$ : WT =  $13 \pm 1 \mu\text{M}$ ;  $\alpha 9\text{E175Q}\alpha 10$  =  $191 \pm 48 \mu\text{M}$ ,  $p < 0,0001$  t-student;  $\alpha 9\alpha 10\text{E175Q}$  =  $79 \pm 14 \mu\text{M}$ ,  $p < 0,0001$  t-student; Tabla 7). Sin embargo, estas curvas evidencian que la concentración 1 mM de ACh es también saturante para los receptores mutantes.

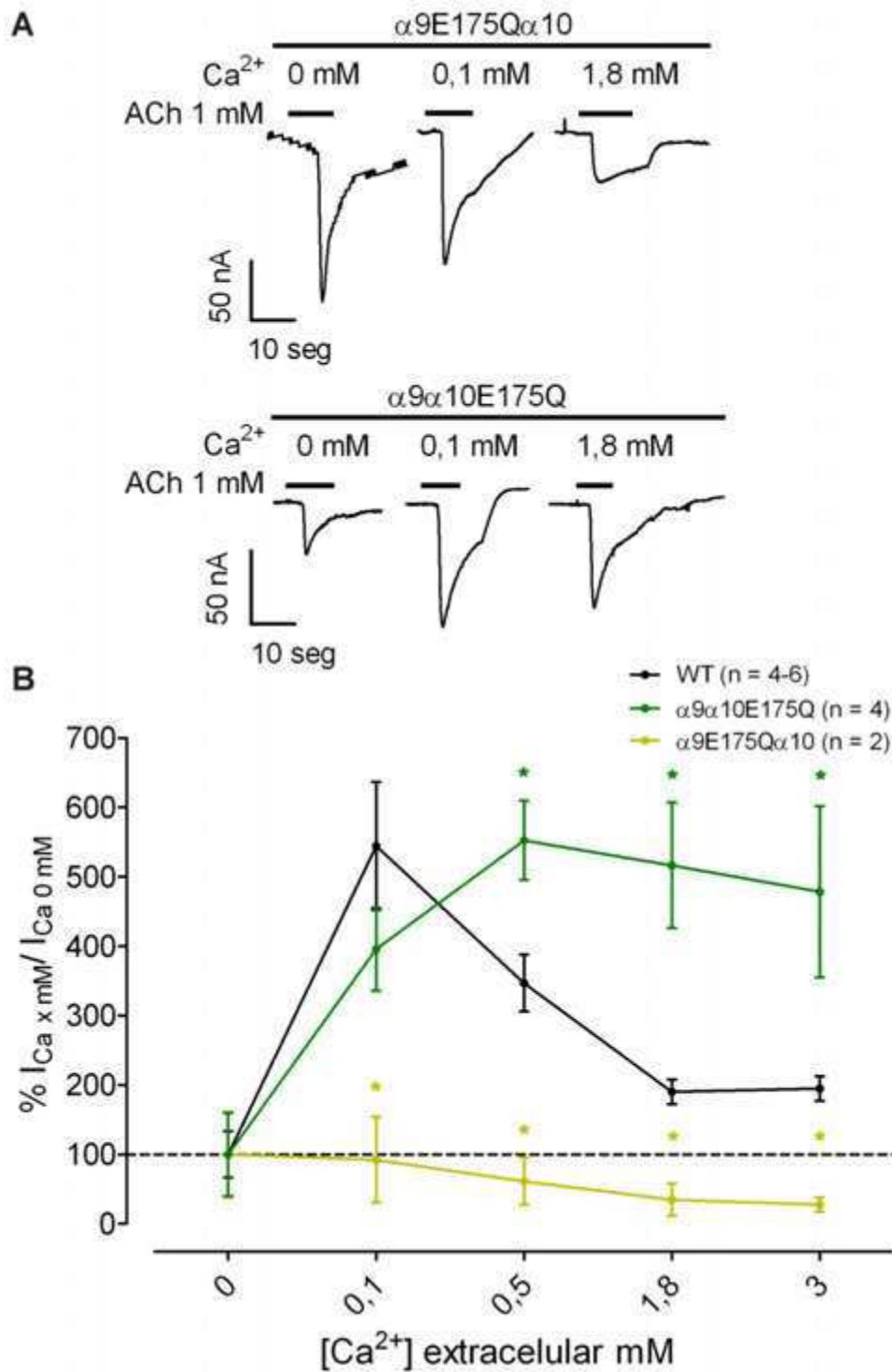


**Figura 20:** Curvas concentración-respuesta para ACh construidas en oocitos que expresan receptores WT (curva negra),  $\alpha 9\text{E175Q}\alpha 10$  (curva amarilla) y  $\alpha 9\alpha 10\text{E175Q}$  (curva verde). Los valores de amplitud de corriente máxima de las respuestas fueron normalizados a los valores registrados a ACh 1 mM (WT) y 10 mM ( $\alpha 9\text{E175Q}\alpha 10$  y  $\alpha 9\alpha 10\text{E175Q}$ ). Se graficó la media y el error estándar de 2 a 8 repeticiones por punto.

La figura 21A muestra trazos representativos de las respuestas evocadas por una concentración de ACh 1 mM a diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular en oocitos que expresan receptores  $\alpha 9\alpha 10$  con la mutación E175Q en sus subunidades  $\alpha 9$  ó  $\alpha 10$ . Normalizamos las respuestas registradas a una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de 0 mM nominal y graficamos los perfiles de modulación (Fig. 20B). La amplitud de la  $I_{\text{máx}}$  de

receptores  $\alpha 9E175Q\alpha 10$  decreció en función de la concentración de  $Ca^{2+}$  extracelular, saturando a 1,8 mM (%  $I_{m\acute{a}x}$  0 mM: Ca 1,8 mM =  $35 \pm 23$  %, n = 2; Ca 3 mM =  $28 \pm 10$  %, n = 2). En cambio, la  $I_{m\acute{a}x}$  de los receptores  $\alpha 9\alpha 10E175Q$  aumentó en función de la concentración de  $Ca^{2+}$  y saturó a  $Ca^{2+}$  0,1 mM (%  $I_{m\acute{a}x}$  0 mM: Ca 0,1 mM =  $396 \pm 60$  %, n = 5; Ca 1,8 mM =  $517 \pm 91$  %, n = 4). El perfil de modulación del receptor con la sustitución E175Q en  $\alpha 9$  no evidenció potenciación significativa al aumentar el  $Ca^{2+}$  extracelular (Fig. 21B). En cambio, el receptor con la mutación en  $\alpha 10$  evidenció la misma potenciación observada en receptores WT entre  $Ca^{2+}$  0 mM y 0,1 mM (Fig. 21B). Sin embargo, al aumentar la concentración de  $Ca^{2+}$  no evidenciamos un bloqueo significativo y la potenciación observada se saturó.

Estos resultados sugieren que, a pesar que el receptor  $\alpha 9$  homomérico no se potencia por  $Ca^{2+}$  extracelular, al mutar su E175 el receptor heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  pierde la potenciación, evidenciando un rol del E175 de la subunidad  $\alpha 9$  en la potenciación por  $Ca^{2+}$  del receptor  $\alpha 9\alpha 10$  heteromérico. Por otro lado, al mutar la subunidad  $\alpha 10$  se perdió el bloqueo por  $Ca^{2+}$  en receptores heteroméricos. Esto plantea que el E175 de  $\alpha 10$  podría estar involucrado en el bloqueo por  $Ca^{2+}$ .



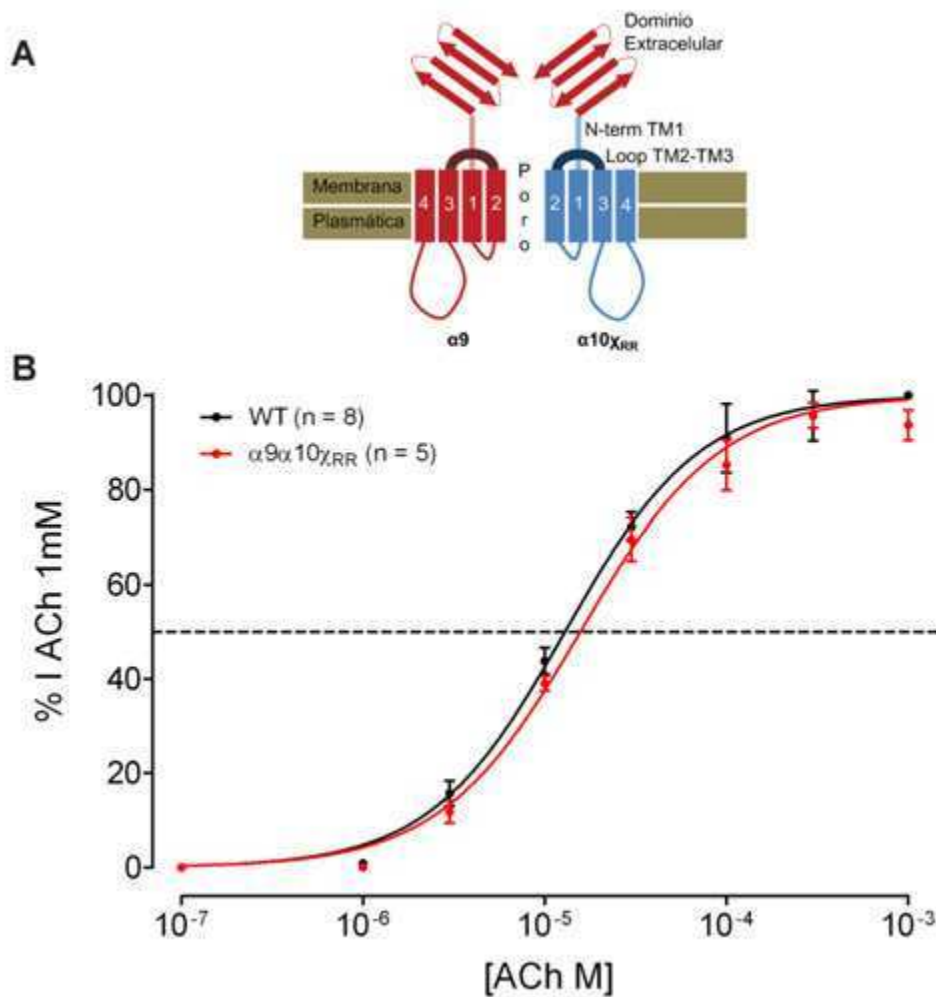
**Figura 21:** A) Trazos representativos de las respuestas evocadas por ACh 1 mM en oocitos que expresan receptores  $\alpha 9E175Q\alpha 10$  (panel superior) o  $\alpha 9\alpha 10E175Q$  (panel inferior). Para cada receptor, los trazos expuestos fueron registrados en un mismo oocito, realizando lavados de 3 min con solución de Ringer luego de cada aplicación y preincubando 2 min con cada concentración de  $Ca^{2+}$  antes de su co-aplicación con ACh. B) Perfiles de modulación por  $Ca^{2+}$  extracelular de los receptores  $\alpha 9\alpha 10$  WT (curva negra),  $\alpha 9E175Q\alpha 10$  (curva amarilla) y  $\alpha 9\alpha 10E175Q$  (curva verde). Las amplitudes de corriente máximas de las respuestas obtenidas a diferentes concentraciones extracelulares de  $Ca^{2+}$  se normalizaron al valor



registrado a  $\text{Ca}^{2+}$  0 mM en el mismo oocito. Se graficó la media y el error estándar de 2 a 6 repeticiones por grupo, \* = significativamente diferente del receptor WT a la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  correspondiente,  $p < 0,05$  Mann Whitney.

### 2.3) Rol de las regiones extracelulares de la subunidad $\alpha 10$ en la modulación por $\text{Ca}^{2+}$ .

Los resultados con subunidades portadoras de la mutación E175Q evidencian que estos residuos en  $\alpha 9$  ó  $\alpha 10$  afectan la modulación del receptor por el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, aunque su efecto depende de la subunidad que la contenga. Es posible que esto sea consecuencia del diferente contexto estructural que representa para el E175 el dominio extracelular de  $\alpha 9$  ó  $\alpha 10$ , ya que este residuo pertenece a este dominio. Con el fin de determinar en qué medida influye el contexto estructural del dominio extracelular de  $\alpha 9$  ó  $\alpha 10$  en la modulación, construimos una subunidad  $\alpha 10$  quimérica en la que reemplazamos su dominio N-terminal extracelular (primeros 210 aminoácidos, incluyendo al loop  $\beta 8$ - $\beta 9$  donde se encuentra el E175) por el de  $\alpha 9$  (de ahora en más, subunidad  $\alpha 10_{\chi_{RR}}$ , Fig. 22A).

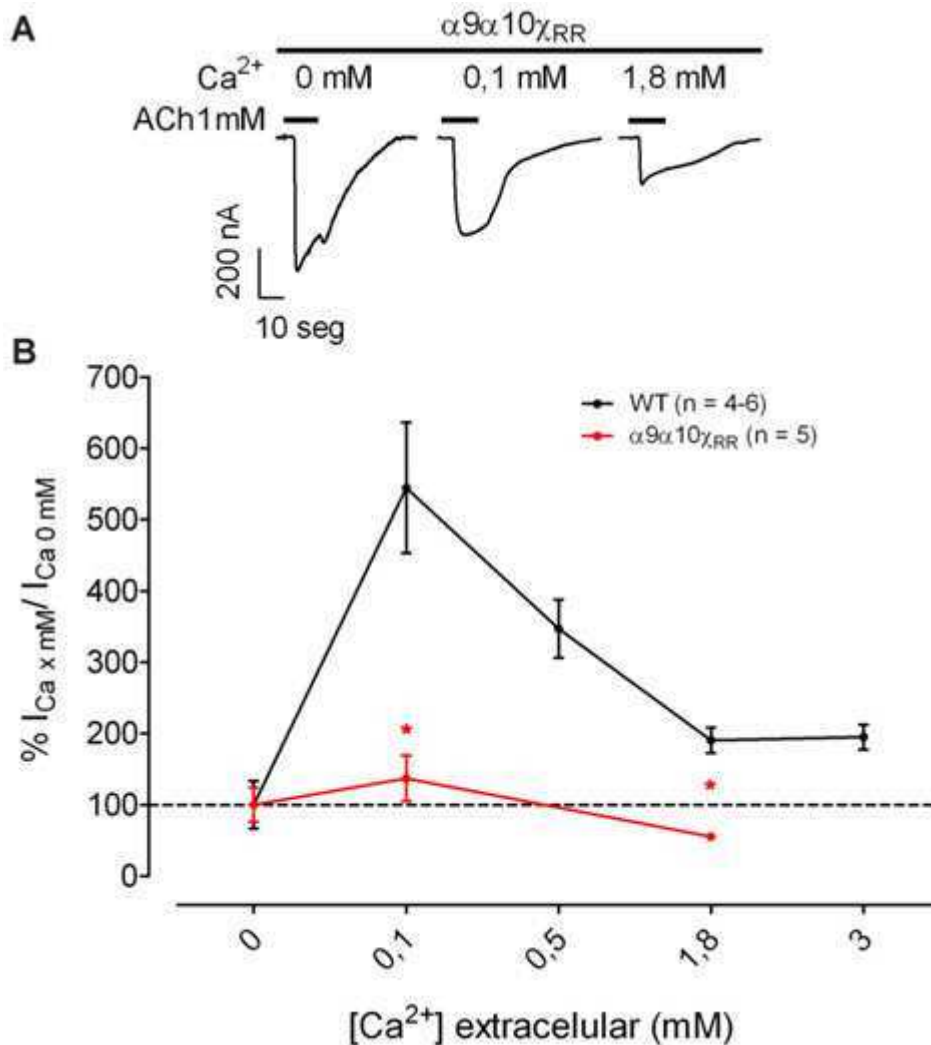


**Figura 22:** A) Esquema de los receptores quiméricos  $\alpha 9\alpha 10\chi_{RR}$ . Se remarca en rojo las secciones correspondientes a la subunidad  $\alpha 9$  y en azul las correspondientes a la subunidad  $\alpha 10$ . B) Curvas concentración-respuesta para ACh construidas en oocitos que expresan receptores WT (curva negra) y  $\alpha 9\alpha 10\chi_{RR}$  (curva roja). Los valores de amplitud de corriente máxima de las respuestas fueron normalizados a los valores registrados a ACh 1 mM. Se graficó la media y el error estándar de 5 a 8 repeticiones por punto.

La figura 22B muestra las curvas concentración-respuesta correspondientes para ACh a la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  del buffer Ringer normal (1,8 mM). Los receptores quiméricos  $\alpha 9\alpha 10\chi_{RR}$  presentaron un valor de  $\text{EC}_{50}$  que no difirió significativamente del valor del receptor WT ( $\text{EC}_{50}$ : WT =  $13 \pm 1 \mu\text{M}$ ;  $\alpha 9\alpha 10\chi_{RR}$  =  $16 \pm 2 \mu\text{M}$ ,  $p = 0,1626$  t-student, Tabla 7). Por lo tanto, la concentración 1 mM de ACh es también saturante para los receptores  $\alpha 9\alpha 10\chi_{RR}$ .

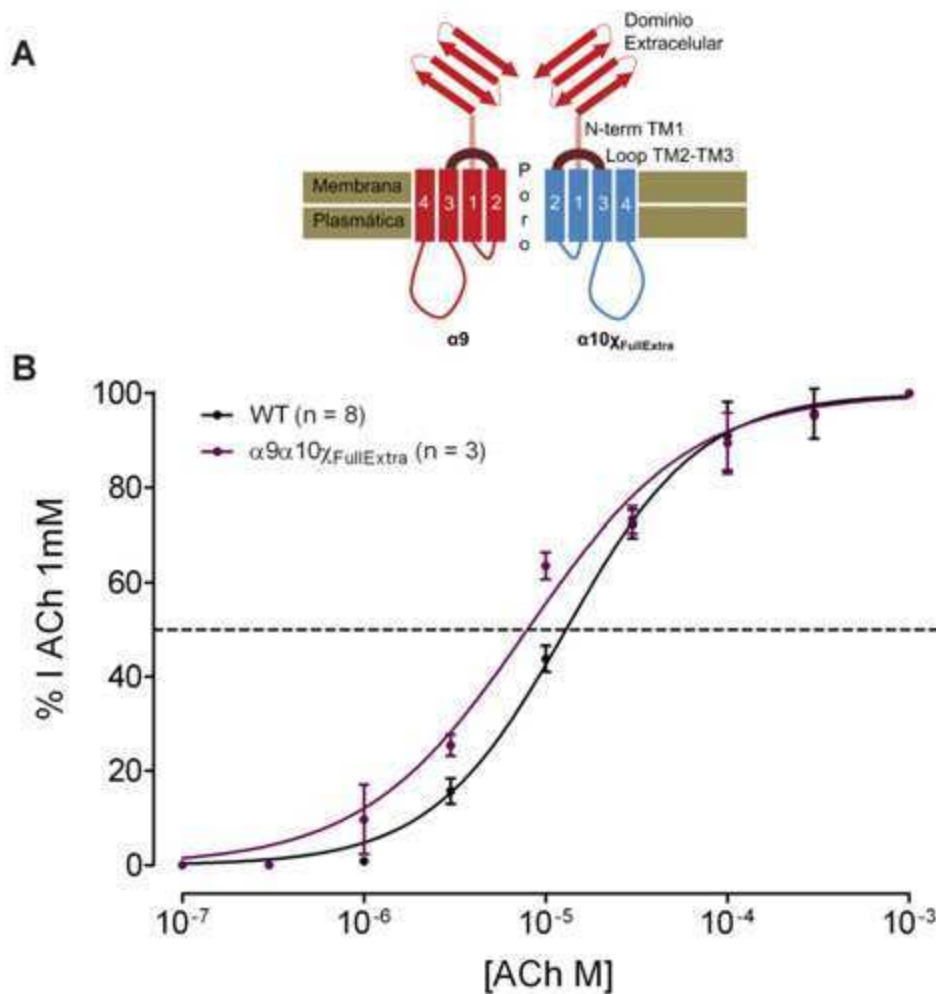
La figura 23A muestra respuestas representativas a ACh 1 mM ante diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular en oocitos que expresan receptores  $\alpha 9\alpha 10\chi_{RR}$ .

Normalizamos las respuestas registradas a una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de 0 mM nominal y graficamos los perfiles de modulación (Fig. 23B). La amplitud de la  $I_{\text{máx}}$  de receptores  $\alpha 9\alpha 10\chi_{\text{RR}}$  aumentó a  $\text{Ca}^{2+}$  0,1 mM, aunque ese aumento no fue significativo (%  $I_{\text{máx}}$  0 mM: Ca 0 mM =  $100 \pm 23$  %, n = 5; Ca 0,1 mM =  $137 \pm 32$  %, n = 5; p = 0,1 Mann Whitney). A concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  superiores, la  $I_{\text{máx}}$  de receptores  $\alpha 9\alpha 10\chi_{\text{RR}}$  decreció significativamente (%  $I_{\text{máx}}$  0 mM: Ca 1,8 mM =  $55 \pm 4$  %, n = 4; p = 5,556 Mann Whitney). El perfil de modulación del receptor  $\alpha 9\alpha 10\chi_{\text{RR}}$  no evidenció potenciación significativa al aumentar el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Fig. 23B). Estos resultados son interesantes ya que en los receptores quiméricos los sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  responsables de la potenciación (que involucran a E175 y a E45) serían interfaces extracelulares homoméricas  $\alpha 9\alpha 9$ . Esto demuestra que  $\alpha 10$  aporta determinantes estructurales extracelulares muy importantes para la potenciación y confirmaría que las interfaces de unión  $\alpha 9\alpha 9$  no serían capaces de generarla.



**Figura 23:** A) Trazos representativos de las respuestas evocadas por ACh 1 mM en oocitos que expresan receptores  $\alpha 9\alpha 10\chi_{RR}$ . Los trazos expuestos fueron registrados en un mismo oocito, realizando lavados de 3 min con solución de Ringer luego de cada aplicación y preincubando 2 min con cada concentración de  $Ca^{2+}$  antes de su co-aplicación con ACh. B) Perfiles de modulación por  $Ca^{2+}$  extracelular de los receptores  $\alpha 9\alpha 10$  WT (curva negra) y  $\alpha 9\alpha 10\chi_{RR}$  (curva roja). Las amplitudes de corriente máximas de las respuestas obtenidas a diferentes concentraciones extracelulares de  $Ca^{2+}$  se normalizaron al valor registrado a  $Ca^{2+}$  0 mM en el mismo oocito. Se graficó la media y el error estándar de 4 a 6 repeticiones por grupo, \* = significativamente diferente del receptor WT a la concentración de  $Ca^{2+}$  correspondiente,  $p < 0,05$  Mann Whitney.

Es importante destacar que el llamado dominio N-terminal extracelular, constituido por los primeros 210 aminoácidos de una subunidad, no es la única región que encara el lado extracelular de la molécula. El tramo N-terminal de TM1 y el loop TM2-TM3 también son extracelulares. En consecuencia, para explorar la importancia de esas regiones construimos subunidades  $\alpha 10$  quiméricas en las que reemplazamos tanto el dominio extracelular como el tramo N-terminal de TM1 y el loop TM2-TM3 por los de  $\alpha 9$  (de ahora en más, subunidad  $\alpha 10\chi_{FullExtra}$ , Fig. 24A).

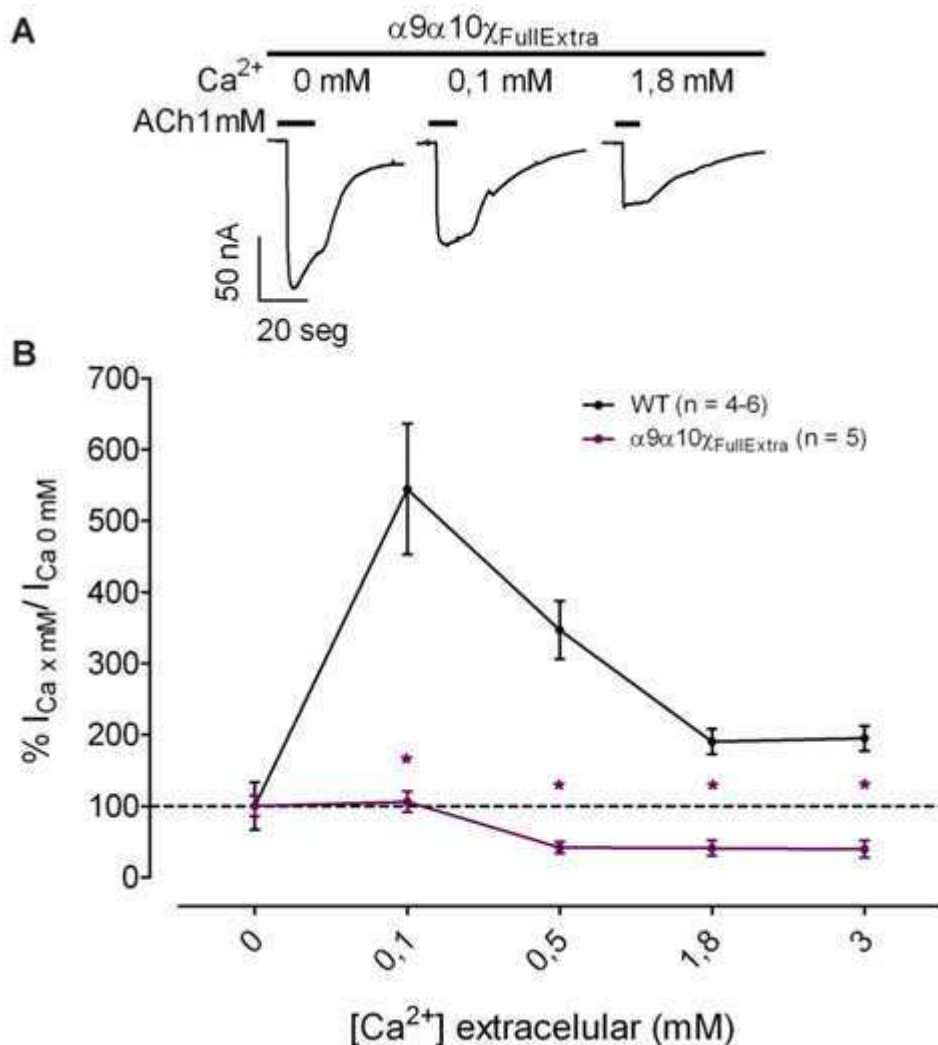


**Figura 24:** A) Esquema de los receptores quiméricos  $\alpha 9\alpha 10\chi_{FullExtra}$ . Se remarca en rojo las secciones correspondientes a la subunidad  $\alpha 9$  y en azul las correspondientes a la subunidad  $\alpha 10$ . B) Curvas concentración-respuesta para ACh construidas en oocitos que expresan receptores WT (curva negra) y  $\alpha 9\alpha 10\chi_{FullExtra}$  (curva violeta). Los valores de amplitud de corriente máxima de las respuestas fueron normalizados a los valores registrados a ACh 1 mM. Se graficó la media y el error estándar de 3 a 8 repeticiones por punto.

La figura 24B expone las curvas concentración-respuesta correspondientes para ACh a  $Ca^{2+}$  1,8 mM. Los receptores quiméricos  $\alpha 9\alpha 10\chi_{FullExtra}$  presentaron un valor de  $EC_{50}$  significativamente diferente del receptor WT ( $EC_{50}$ : WT =  $13 \pm 1 \mu M$ ;  $\alpha 9\alpha 10\chi_{FullExtra}$  =  $8 \pm 1 \mu M$ ,  $p = 0,02$  t-student; Tabla 7). Las curvas corroboran que la concentración 1 mM de ACh es saturante para el receptor quimérico.

La figura 25A muestra respuestas representativas a ACh 1 mM ante diferentes concentraciones de  $Ca^{2+}$  extracelular en oocitos que expresan receptores  $\alpha 9\alpha 10\chi_{FullExtra}$ . Normalizamos las respuestas con respecto a las registradas a  $Ca^{2+}$  0 mM nominal y graficamos los perfiles de modulación (Fig. 25B). La  $I_{m\acute{a}x}$  de receptores  $\alpha 9\alpha 10\chi_{FullExtra}$

disminuyó significativamente en función de la concentración extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , saturando a 0,5 mM, ( $\% I_{\text{máx } 0 \text{ mM}}$ : Ca 0 mM =  $106 \pm 14 \%$ , n = 5; Ca 0,5 mM =  $42 \pm 8 \%$ , n = 5; p = 0,0317 Mann Whitney; Ca 3 =  $39 \pm 12 \%$ , n = 5). Los perfiles de modulación de estos receptores quiméricos tampoco evidenciaron potenciación significativa. El perfil de modulación de este receptor quimérico no es significativamente diferente del obtenido con receptores  $\alpha 9\alpha 10\chi_{\text{RR}}$  al compararlos punto a punto (p > 0,05 Kruskal Wallis seguido de contrastes de Dunn). Esta similitud entre los perfiles de modulación generados por las quimeras  $\alpha 9\alpha 10\chi_{\text{RR}}$  y  $\alpha 9\alpha 10\chi_{\text{FullExtra}}$  implican que a pesar de ser extracelulares, el tramo N-terminal de TM1 y el loop TM2-TM3 no influyen marcadamente la modulación por  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figura 25:** A) Trazos representativos de las respuestas evocadas por ACh 1 mM en oocitos que expresan receptores  $\alpha 9\alpha 10\chi_{\text{FullExtra}}$ . Los trazos expuestos fueron registrados en un mismo oocito, realizando lavados de 3 min con solución de Ringer luego de cada aplicación y preincubando 2 min con cada concentración

de  $\text{Ca}^{2+}$  antes de su co-aplicación con ACh. B) Perfiles de modulación por  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular de los receptores  $\alpha 9\alpha 10$  WT (curva negra) y  $\alpha 9\alpha 10_{\chi_{\text{FullExtra}}}$  (curva violeta). Las amplitudes de corriente máximas de las respuestas obtenidas a diferentes concentraciones extracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  se normalizaron al valor registrado a  $\text{Ca}^{2+}$  0 mM en el mismo oocito. Se graficó la media y el error estándar de 4 a 6 repeticiones por grupo, \* = significativamente diferente del receptor WT a la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  correspondiente,  $p < 0,05$  Mann Whitney.

#### 2.4) Residuos candidatos involucrados en la potenciación por $\text{Ca}^{2+}$ extracelular.

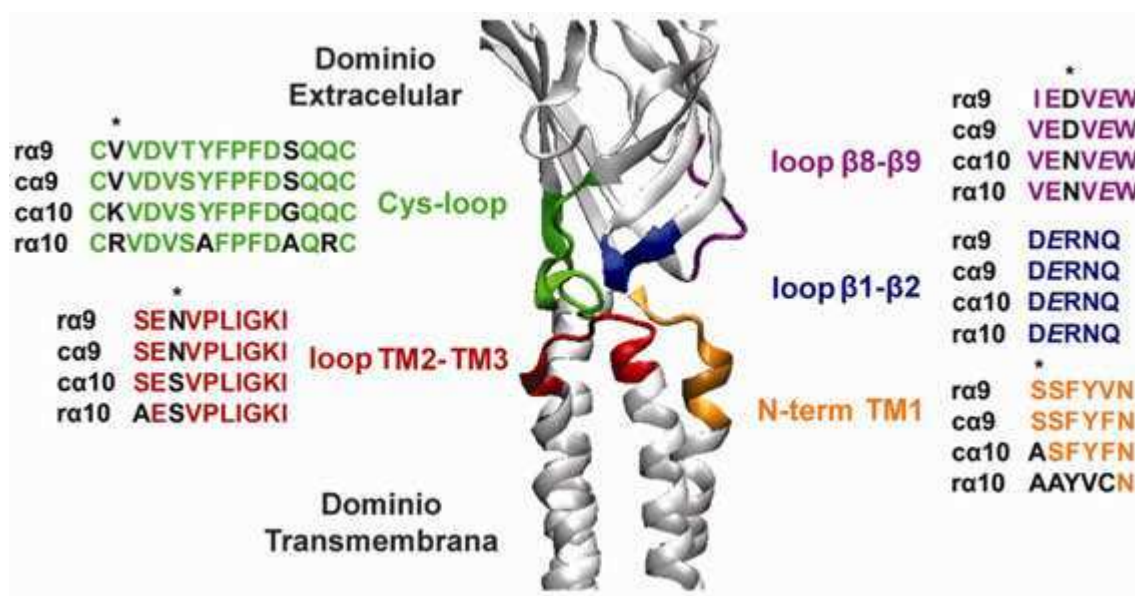
Con el objetivo de determinar qué residuos de la región extracelular de  $\alpha 10$  podrían constituir el contexto estructural que permitiría la potenciación, comparamos las secuencias aminoacídicas de las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$ . Recientemente se ha caracterizado la modulación por  $\text{Ca}^{2+}$  de los receptores  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  de pollo, los cuales presentan perfiles de modulación similares a los de sus respectivos receptores de rata (Lipovsek, 2011). La subunidad  $\alpha 10$  de pollo forma canales homoméricos funcionales en oocitos, los cuales presentan un perfil de modulación por  $\text{Ca}^{2+}$  con una predominante potenciación (Lipovsek, 2011), lo que confirma que  $\alpha 10$  aporta determinantes estructurales necesarios para la potenciación. A pesar de esto, la subunidad  $\alpha 10$  de pollo tiene una secuencia aminoacídica muy similar a la de  $\alpha 9$  de rata o pollo, cuyos receptores  $\alpha 9$  homoméricos solo presentan bloqueo por  $\text{Ca}^{2+}$  (Lipovsek, 2011). En consecuencia, los residuos en común entre la subunidad  $\alpha 10$  de pollo y las subunidades  $\alpha 9$  posiblemente no estén relacionados con la potenciación por  $\text{Ca}^{2+}$ . En cambio los residuos en común entre  $\alpha 10$  de pollo y de rata, que no estén conservados en las subunidades  $\alpha 9$ , serían candidatos a estar relacionados con la potenciación.

Dada la similitud de secuencia entre  $\alpha 10$  de pollo y las subunidades  $\alpha 9$ , estas comparaciones de secuencias nos permitirían delimitar un número acotado de residuos candidatos en  $\alpha 10$  de rata. Decidimos centrar nuestro análisis en las secuencias de los loops que constituyen la interfaz extracelular-transmembrana de la subunidad ya que el sitio propuesto de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentra en esta región entre los loops  $\beta 1$ - $\beta 2$  (E45) y  $\beta 8$ - $\beta 9$  (E175) de subunidades adyacentes (Le Novere *et al.*, 2002). Los loops de esta interfaz son:  $\beta 1$ - $\beta 2$ , Cys-loop,  $\beta 8$ - $\beta 9$ , tramo N-terminal de TM1 y TM2-TM3. Siguiendo este análisis, mutamos los residuos candidatos en  $\alpha 10$  de rata por los correspondientes de  $\alpha 9$  de rata.

El loop  $\beta 1$ - $\beta 2$  no presenta ninguna diferencia de residuos entre las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  (Fig. 26). El Cys-loop presenta dos diferencias de residuos en la posición 129

(numeración de la subunidad  $\alpha 1$  de *T. marmorata*) y 139 (Fig. 26). La diferencia en la posición 129 es particularmente interesante ya que representa un cambio de un residuo con carga positiva (Arg) a un residuo hidrofóbico (Val). En consecuencia, generamos subunidades  $\alpha 10$  portadoras de la sustitución R129V.

El loop  $\beta 8-\beta 9$  presenta una única diferencia de residuos en posición 173 (Fig. 26). Esta diferencia es interesante ya que es vecina al E175 conservado que conforma el sitio de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  propuesto. Por consiguiente, generamos subunidades  $\alpha 10$  con la mutación N173D. También encontramos una única diferencia de residuos en el tramo N-terminal de TM1 y en el loop TM2-TM3, que fueron A211S y S270N respectivamente (Fig. 26). Generamos subunidades  $\alpha 10$  portadoras de estas mutaciones en forma individual.



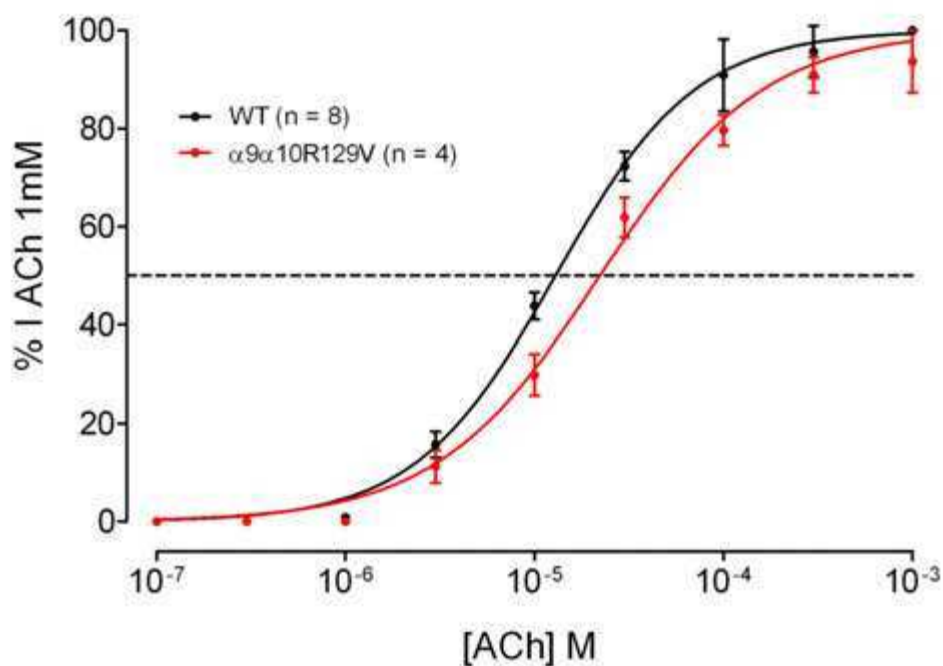
**Figura 26:** Esquema de la interfaz extracelular-transmembrana de una subunidad nicotínica. Se detalla para cada uno de los componentes de esta interfaz la secuencia aminoacídica correspondiente a  $\alpha 9$  de rata ( $\text{ra}9$ ),  $\alpha 9$  de pollo ( $\text{ca}9$ ),  $\alpha 10$  de rata ( $\text{ra}10$ ) y  $\alpha 10$  de pollo ( $\text{ca}10$ ). Los residuos sin similitud de secuencia se marcan en negro. Los residuos candidatos elegidos para mutar se marcan con un asterisco. Los residuos E45 del loop  $\beta 1-\beta 2$  y E175 del loop  $\beta 8-\beta 9$  se remarcan en itálica.

## 2.5) Efecto de la sustitución R129V en el Cys-loop sobre la potenciación por $\text{Ca}^{2+}$ .

La figura 27 muestra curvas concentración-respuesta para ACh a  $\text{Ca}^{2+}$  1,8 mM construidas en oocitos que expresan receptores  $\alpha 9\alpha 10$  con la mutación R129V en el



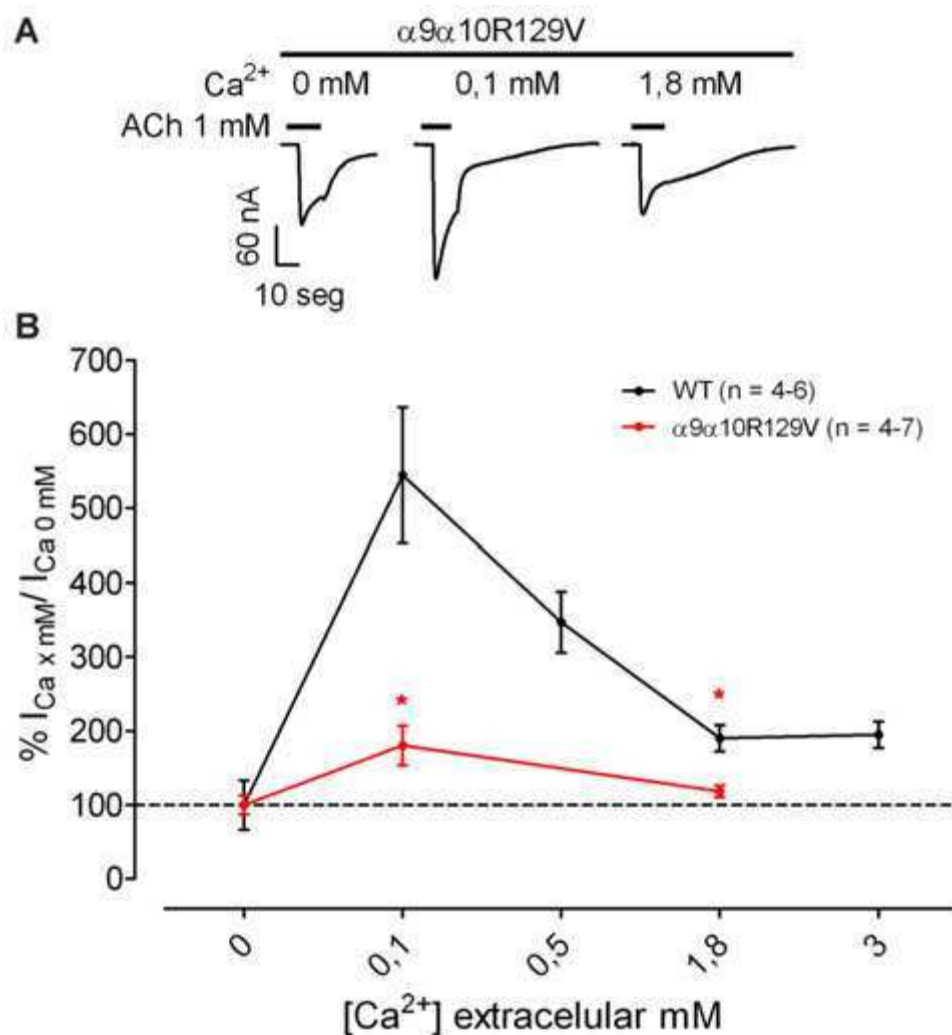
Cys-loop de la subunidad  $\alpha 10$  (Fig. 26). El receptor mutante presentó un corrimiento de las curvas concentración-respuesta hacia la derecha y, en consecuencia, un valor de  $EC_{50}$  significativamente mayor al WT ( $EC_{50}$ : WT =  $13 \pm 1 \mu\text{M}$ ;  $\alpha 9\alpha 10R129V$  =  $22 \pm 4 \mu\text{M}$ ,  $p = 0,0145$  t-student, Tabla 7). Estas curvas evidencian que la concentración 1 mM de ACh es también saturante para los receptores mutantes.



**Figura 27:** Curvas concentración-respuesta para ACh construidas en oocitos que expresan receptores WT (curva negra) y  $\alpha 9\alpha 10R129V$  (curva roja). Los valores de amplitud de corriente máxima de las respuestas fueron normalizados a los valores registrados a ACh 1 mM. Se graficó la media y el error estándar de 4 a 8 repeticiones por punto.

La figura 28A muestra trazos representativos de las respuestas evocadas por ACh 1 mM a diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en oocitos que expresan receptores  $\alpha 9\alpha 10R129V$ . La amplitud de las respuestas evocadas por ACh 1 mM mostró un aumento a  $\text{Ca}^{2+}$  0,1 mM y una disminución a  $\text{Ca}^{2+}$  1,8 mM. Normalizamos las respuestas registradas a  $\text{Ca}^{2+}$  0 mM nominal y graficamos los perfiles de modulación (Fig. 28B). Si bien la amplitud de las respuestas evocadas por ACh 1 mM mostró una tendencia a aumentar a  $\text{Ca}^{2+}$  0,1 mM y disminuir a  $\text{Ca}^{2+}$  1,8 mM (Fig. 28A) el valor de  $I_{\text{máx}}$  normalizada promedio de los receptores  $\alpha 9\alpha 10R129V$  no cambió significativamente en función de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (%  $I_{\text{máx}} 0 \text{ mM}$ : Ca

0 mM =  $100 \pm 13$  %, n = 5; Ca 0,1 mM =  $180 \pm 27$  %, n = 7; Ca 1,8 mM =  $118 \pm 8$  %, n = 4;  $p > 0,05$  Kruskal Wallis seguido de contrastes de Dunn). En consecuencia concluimos que el receptor heteromérico con la sustitución R129V en  $\alpha 10$  no sufre una potenciación o un bloqueo significativo al aumentar el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Fig. 28B). En conjunto, estos resultados implican que la mutación R129V en  $\alpha 10$  podría reducir la potenciación y el bloqueo y por lo tanto la R129 en el Cys-loop de subunidades  $\alpha 10$  estaría involucrada en la modulación.

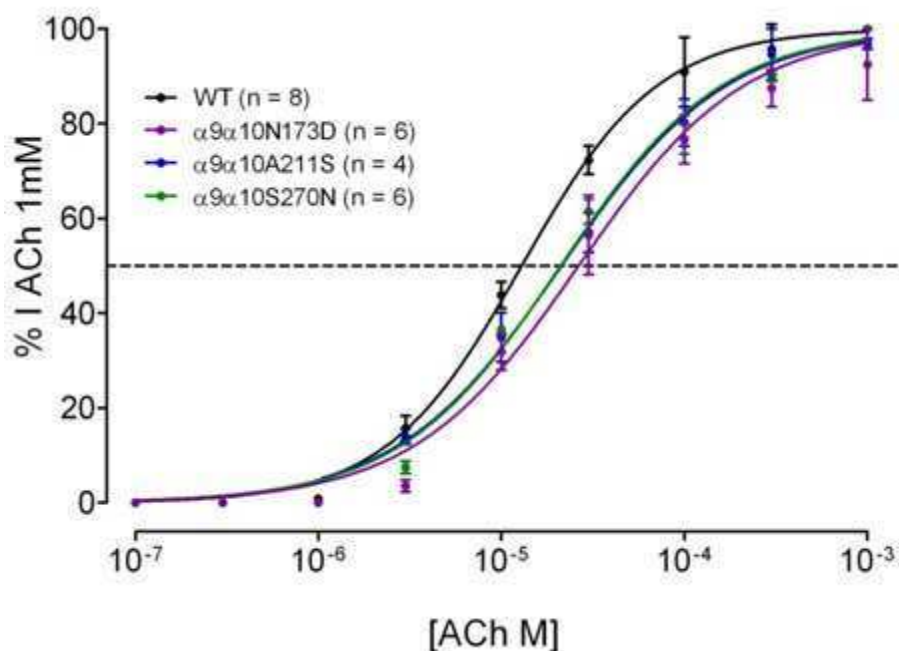


**Figura 28:** A) Trazos representativos de las respuestas evocadas por ACh 1 mM en oocitos que expresan receptores  $\alpha 9\alpha 10R129V$ . Los trazos expuestos fueron registrados en un mismo oocito, realizando lavados de 3 min con solución de Ringer luego de cada aplicación y preincubando 2 min con cada concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  antes de su co-aplicación con ACh. B) Perfiles de modulación por  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular de los receptores  $\alpha 9\alpha 10$  WT (curva negra) y  $\alpha 9\alpha 10R129V$  (curva roja). Las amplitudes de corriente máximas de las respuestas obtenidas a diferentes concentraciones extracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  se normalizaron al valor registrado a  $\text{Ca}^{2+}$  0 mM en el mismo oocito. Se graficó la media y el error estándar de 4 a 7 repeticiones

por grupo, \* = significativamente diferente del receptor WT a la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  correspondiente,  $p < 0,05$  Mann Whitney.

2.6) Efecto de la sustitución N173D en el loop  $\beta 8$ - $\beta 9$ , A211S en el tramo N-terminal de TM1 ó S270N en el loop TM2-TM3 sobre la potenciación por  $\text{Ca}^{2+}$ .

La figura 29 expone curvas concentración-respuesta para ACh a  $\text{Ca}^{2+}$  1,8 mM construidas en oocitos que expresan receptores  $\alpha 9\alpha 10$  con la mutación N173D, A211S o S270N, en el loop  $\beta 8$ - $\beta 9$ , N-terminal de TM1 ó loop TM2-TM3 respectivamente, de la subunidad  $\alpha 10$  (Fig. 26). El valor de  $\text{EC}_{50}$  para ACh a  $\text{Ca}^{2+}$  1,8 mM de los receptores mutantes fue significativamente mayor al del receptor WT ( $\text{EC}_{50}$ : WT =  $13 \pm 1 \mu\text{M}$ ;  $\alpha 9\alpha 10\text{N173D}$  =  $26 \pm 4 \mu\text{M}$ ,  $p = 0,0036$  t-student;  $\alpha 9\alpha 10\text{A211S}$  =  $21 \pm 3 \mu\text{M}$ ,  $p = 0,0091$  t-student;  $\alpha 9\alpha 10\text{S270N}$  =  $21 \pm 2 \mu\text{M}$ ,  $p = 0,0022$  t-student; Tabla 7). La concentración 1 mM de ACh fue saturante para todos ellos.



**Figura 29:** Curvas concentración-respuesta para ACh construidas en oocitos que expresan receptores WT (curva negra),  $\alpha 9\alpha 10\text{N173D}$  (curva violeta),  $\alpha 9\alpha 10\text{A211S}$  (curva azul) y  $\alpha 9\alpha 10\text{S270N}$  (curva verde). Los valores de amplitud de corriente máxima de las respuestas fueron normalizados a los valores registrados a ACh 1 mM. Se graficó la media y el error estándar de 4 a 8 repeticiones por punto.

Receptor	EC <sub>50</sub> (μM)	p	Hill	p	n	R <sup>2</sup>
α9α10	13 ± 1		1,2 ± 0,1		8	0,9413
α9E175Qα10	191 ± 48	<0,0001*	1,1 ± 0,2	0,6666	2	0,9258
α9α10E175Q	79 ± 14	<0,0001*	1,0 ± 0,1	0,2389	4	0,9240
α9α10χ <sub>RR</sub>	16 ± 2	0,1626	1.1 ± 0.1	0,5183	5	0,9653
α9α10χ <sub>FullExtra</sub>	8 ± 1	<0,02*	1,0 ± 0,1	0,2895	3	0,9652
α9α10R129V	22 ± 4	0,0145*	1,0 ± 0,1	0,2389	4	0,9628
α9α10N173D	26 ± 4	0,0036*	1,0 ± 0,1	0,1918	6	0,9011
α9α10A211S	21 ± 3	0,0091*	1,0 ± 0,1	0,2389	4	0,9633
α9α10S270N	21 ± 2	0,0022*	1,0 ± 0,1	0,1918	6	0,9803

**Tabla 7:** Parámetros de las curvas concentración-respuesta. Los valores p reportados corresponden a pruebas *t* de Student contrastando contra los valores obtenidos para el receptor WT correspondiente.

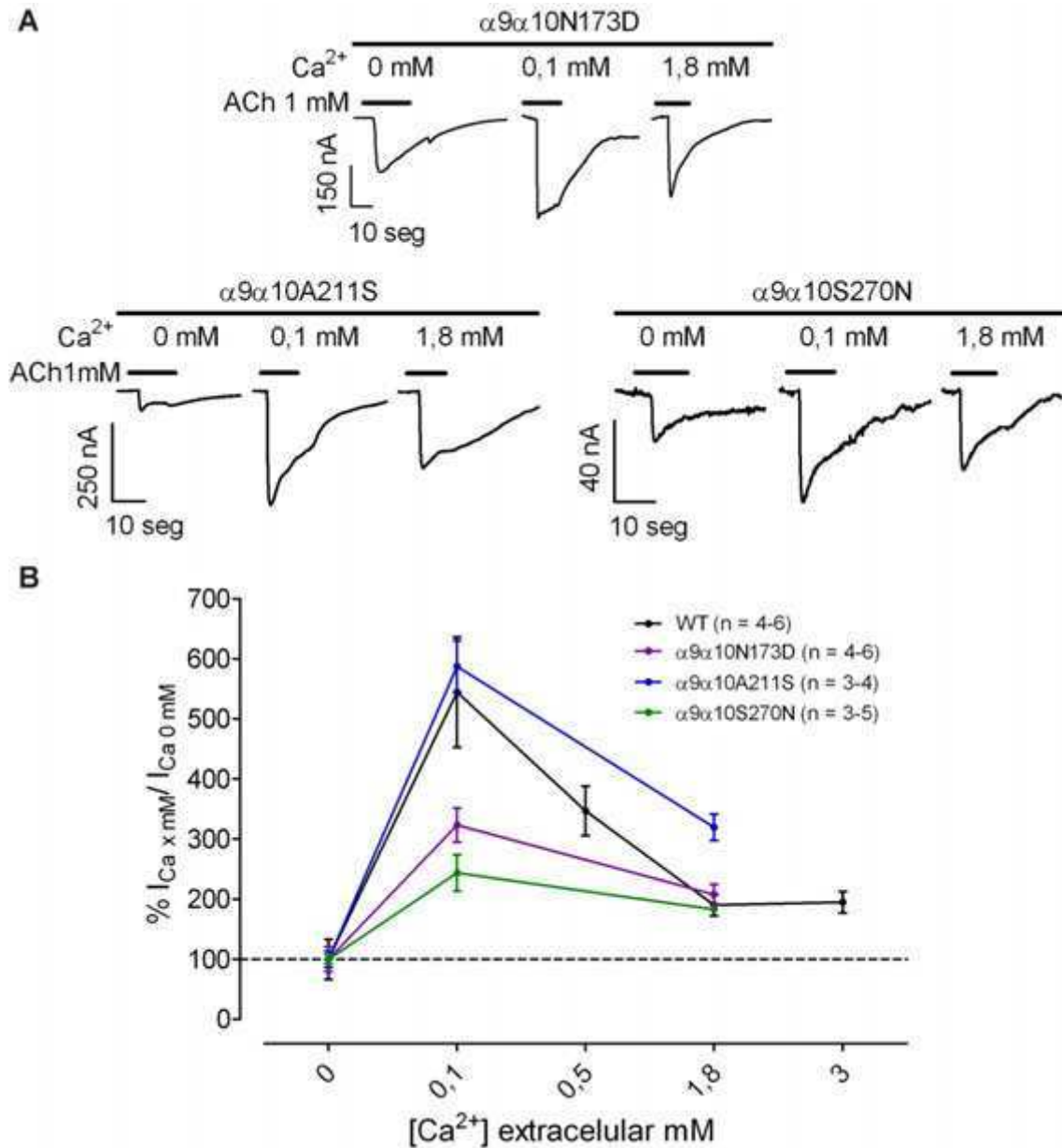
La figura 30A muestra trazos representativos de las respuestas evocadas por ACh 1 mM a diferentes concentraciones de Ca<sup>2+</sup> en oocitos que expresan receptores α9α10N173D, α9α10A211S o α9α10S270N. Normalizamos las respuestas registradas a Ca<sup>2+</sup> 0 mM nominal para construir sus perfiles de modulación (Fig. 30B). Nuevamente, la amplitud de las respuestas evocadas por ACh 1 mM mostró para todas las mutaciones una tendencia a aumentar a Ca<sup>2+</sup> 0,1 mM y disminuir a Ca<sup>2+</sup> 1,8 mM, en diferentes proporciones (Fig. 30A, B). Sin embargo, los valores de I<sub>máx</sub> normalizada promedio de los receptores mutantes, a las diferentes concentraciones de Ca<sup>2+</sup> ensayadas, no fueron significativamente diferentes a los valores correspondientes observados con el receptor WT (Fig. 30B; Tabla 8, *p* > 0,05 Kruskal Wallis seguido de contrastes de Dunn).

Receptor\ [Ca <sup>2+</sup> ]	0 mM	0,1 mM	1,8 mM
WT	100 ± 33% (n=5)	544 ± 92 % (n=6)	190 ± 18 % (n=5)
α9α10N173D	101 ± 21 % (n=4)	323 ± 28 % (n=6)	207 ± 17 % (n=6)
α9α10A211S	100 ± 14 % (n=3)	587 ± 43 % (n=3)	320 ± 22 % (n=4)
α9α10S270N	100 ± 8 % (n=3)	243 ± 31 % (n=5)	183 ± 2 % (n=4)

**Tabla 8:** Valores de I<sub>máx</sub> normalizadas a las respuestas registradas a Ca<sup>2+</sup> 0 mM nominal (% I<sub>máx</sub> 0 mM) observados a diferentes concentraciones de Ca<sup>2+</sup> extracelular para los receptores WT, α9α10N173D, α9α10A211S y α9α10S270N.

En consecuencia, concluimos que estas mutaciones en α10 no causan cambios significativos en la potenciación ni en el bloqueo por Ca<sup>2+</sup> extracelular del receptor

heteromérico (Fig. 30B). Aunque ninguna de estas sustituciones mostró ser individualmente suficiente para afectar significativamente la modulación, no podemos descartar que los tres residuos en conjunto estén involucrados en este proceso.



**Figura 30:** A) Trazos representativos de las respuestas evocadas por ACh 1 mM en oocitos que expresan receptores  $\alpha 9\alpha 10N173D$ ,  $\alpha 9\alpha 10A211S$  o  $\alpha 9\alpha 10S270N$ . Para cada receptor, los trazos expuestos fueron registrados en un mismo oocito, realizando lavados de 3 min con solución de Ringer luego de cada aplicación y preincubando 2 min con cada concentración de Ca<sup>2+</sup> antes de su co-aplicación con ACh. B) Perfiles de modulación por Ca<sup>2+</sup> extracelular de los receptores  $\alpha 9\alpha 10$  WT (curva negra),  $\alpha 9\alpha 10N173D$  (curva violeta),  $\alpha 9\alpha 10A211S$  (curva azul) y  $\alpha 9\alpha 10S270N$  (curva verde). Las amplitudes de corriente máximas de las respuestas obtenidas a diferentes concentraciones extracelulares de Ca<sup>2+</sup> se normalizaron

al valor registrado a  $\text{Ca}^{2+}$  0 mM en el mismo oocito. Se graficó la media y el error estándar de 3 a 6 repeticiones por grupo, \* = significativamente diferente del receptor WT a la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  correspondiente,  $p < 0,05$  Mann Whitney.

## 2.7) Discusión.

En este capítulo describimos resultados experimentales que evidencian que el sitio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  propuesto para el receptor  $\alpha 7$  (Le Novere *et al.*, 2002) estaría conservado en  $\alpha 9\alpha 10$ . Este sitio involucra los residuos E45 y E175, cada uno expuesto por un dominio extracelular de dos subunidades adyacentes en el pentámero, que constituyen así una interfaz de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 17) (Le Novere *et al.*, 2002). En consecuencia, los receptores homoméricos tendrían sitios equivalentes mientras que en los receptores heteroméricos los sitios podrían no ser iguales.

Las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  tienen los residuos E45 y E175 conservados. Sin embargo, el receptor  $\alpha 9$  homomérico no es potenciado por  $\text{Ca}^{2+}$  (Katz *et al.*, 2000), lo que sugiere que las interfaces  $\alpha 9\text{-}\alpha 9$  no generarían una potenciación. Posiblemente, a pesar de tener conservados los residuos E45 y E175, las interfaces de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  del receptor  $\alpha 9$  homomérico no sean capaces de generar los cambios conformacionales necesarios para producir la potenciación. Se ha reportado que la mutación E175Q anula la potenciación por  $\text{Ca}^{2+}$  del receptor  $\alpha 7$  homomérico (Galzi *et al.*, 1996). En el receptor  $\alpha 9\alpha 10$ , la mutación E175Q en  $\alpha 9$  anuló la potenciación por  $\text{Ca}^{2+}$ , evidenciando la importancia del E175 de  $\alpha 9$  para la potenciación del receptor heteromérico. En consecuencia, es posible que en el receptor heteromérico los E175 de las subunidades  $\alpha 9$  estén enfrentados con los E45 de subunidades  $\alpha 10$ , generando una interfaz de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  heteromérica que sí es capaz de producir los cambios conformacionales que causan la potenciación. En el futuro planeamos producir subunidades  $\alpha 10$  portadoras de la mutación E45Q para poner esto a prueba. Se ha determinado que esta mutación reduce mucho la potenciación por  $\text{Ca}^{2+}$  del receptor  $\alpha 7$  aunque no llega a anularla (Galzi *et al.*, 1996). Por lo tanto, esperamos que la sustitución E45Q en  $\alpha 9$  ó  $\alpha 10$  tenga un efecto en la modulación del receptor  $\alpha 9\alpha 10$  que nos permita evaluar la importancia de este residuo. Si nuestra hipótesis acerca de una interfaz de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  donde el E175 de  $\alpha 9$  está enfrentado con el E45 de  $\alpha 10$  en el receptor heteromérico es correcta, esperamos que los resultados que obtendríamos con el receptor  $\alpha 9\alpha 10\text{E}45\text{Q}$  sean similares a los observados en este trabajo con el receptor  $\alpha 9\text{E}175\text{Q}\alpha 10$ .

La mutación E175Q en  $\alpha 10$  no anuló la potenciación por  $\text{Ca}^{2+}$ , en contraste con lo reportado para esta mutación en receptores  $\alpha 7$  homoméricos (Galzi *et al.*, 1996) y lo observado en receptores  $\alpha 9$  homoméricos. Por el contrario, los receptores  $\alpha 9\alpha 10\text{E175Q}$  no presentaron un bloqueo por  $\text{Ca}^{2+}$  significativo. Es interesante que esta mutación en un residuo conservado relacionado con la potenciación no afecte ese proceso y en cambio afecte el bloqueo, el cual depende principalmente del poro, al ser un bloqueo por permeación (Katz *et al.*, 2000). Se ha determinado que el E175 estaría orientado hacia el lumen del vestíbulo del canal, muy cerca de la entrada al poro (Eddins *et al.*, 2002a; Eddins *et al.*, 2002b). Más aún, a partir de simulaciones de la cinética del cationes viajando a través del nAChR del órgano eléctrico de Torpedo se sugirió que estos iones permanecerían períodos de tiempo relativamente largos en determinadas zonas del vestíbulo extracelular con residuos cargados negativamente (Imoto *et al.*, 1988). Esto plantea que además del poro, el vestíbulo extracelular afectaría la permeabilidad iónica (Imoto *et al.*, 1988). Simulaciones similares realizadas con un modelo de homología del receptor  $\alpha 9\alpha 10$  de rata sustentan que residuos del vestíbulo extracelular también afectan la permeabilidad iónica en este receptor (Lipovsek *et al.*, en prensa). Teniendo esto en cuenta, es posible que al estar en las inmediaciones del poro, este residuo con carga negativa pueda afectar el bloqueo por permeación que causa el  $\text{Ca}^{2+}$ .

Los efectos opuestos que observamos al mutar el E175 en  $\alpha 9$  ó  $\alpha 10$  plantean que el contexto estructural que representa cada subunidad para ese residuo podría determinar su rol en la modulación. El E175 se encuentra en el loop  $\beta 8\text{-}\beta 9$  (Le Novere *et al.*, 2002) dentro del dominio extracelular de las subunidades, constituido por los primeros 210 residuos N-terminales (Karlin, 2002). Además de esos 210 residuos N-terminales, también son extracelulares el loop TM2-TM3 y el tramo N-terminal de TM1, los cuales están próximos al loop  $\beta 8\text{-}\beta 9$  que contiene al E175 (Bouzat *et al.*, 2008). Pusimos a prueba en qué medida el contexto estructural que representan estas regiones extracelulares de  $\alpha 9$  ó  $\alpha 10$  afecta la potenciación por  $\text{Ca}^{2+}$  construyendo subunidades quiméricas. Los resultados obtenidos con los receptores quiméricos  $\alpha 9\alpha 10\chi_{\text{RR}}$  evidencian que los dominios extracelulares de  $\alpha 10$ , constituidos por sus primeros 210 residuos, son indispensables para la potenciación por  $\text{Ca}^{2+}$ . Por otro lado, nuestros resultados con receptores  $\alpha 9\alpha 10\chi_{\text{FullExtra}}$  sugieren que los restantes tramos extracelulares de la subunidad  $\alpha 10$  (tramo N-terminal de TM1 y loop TM2-TM3), no afectarían la modulación significativamente. Considerando estos resultados en conjunto

con los observados con la mutación E175Q, podemos decir que el E175 de  $\alpha 9$  y los dominios extracelulares de  $\alpha 10$ , constituidos por sus 210 residuos N-terminales, son los determinantes estructurales de la potenciación por  $\text{Ca}^{2+}$  del receptor  $\alpha 9\alpha 10$ . De este modo, el E175 de  $\alpha 9$  al enfrentarse con un dominio extracelular de  $\alpha 10$  formaría una interfaz de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  que es capaz de producir los cambios estructurales que causan la potenciación. Estas observaciones sustentan nuestra hipótesis acerca de una interfaz de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  donde el E175 en el loop  $\beta 8$ - $\beta 9$  de  $\alpha 9$  estaría enfrentado con el E45 en el loop  $\beta 1$ - $\beta 2$  del dominio extracelular de  $\alpha 10$  (Fig. 17). Sin embargo, nuestros resultados con receptores  $\alpha 9\alpha 10\text{E175Q}$  sugieren que quizás la sección del dominio extracelular de  $\alpha 10$  que expone su E175, es decir el loop  $\beta 8$ - $\beta 9$ , podría causar que este residuo afecte al bloqueo y no la potenciación. Por lo tanto, el contexto estructural que representaría el loop  $\beta 8$ - $\beta 9$  de las subunidades  $\alpha 9$  ó  $\alpha 10$  podría ser responsable de los diferentes efectos observados con la mutación E175Q.

Los resultados que obtuvimos con la mutación R129V plantean que el residuo R129 en el Cys-loop del dominio extracelular de  $\alpha 10$  podría formar parte del mencionado contexto estructural asociado a la potenciación por  $\text{Ca}^{2+}$ . El Cys-loop se encuentra en la interfaz extracelular-transmembrana de las subunidades nicotínicas, la cual es una región del receptor que influye al proceso de “gating” (Bouzat *et al.*, 2008). Por lo tanto, es posible que la mutación R129 afecte el mecanismo alostérico de potenciación. Ya se ha reportado la importancia para la modulación por  $\text{Ca}^{2+}$  de componentes de la interfaz extracelular-transmembrana, como los loop  $\beta 1$ - $\beta 2$  y  $\beta 8$ - $\beta 9$ , que exponen los E45 y E175 respectivamente (Galzi *et al.*, 1996). Sin embargo, la influencia de otros componentes de la interfaz extracelular-transmembrana como el Cys-loop aún no se había caracterizado. Este es el primer reporte evidenciando la importancia del Cys-loop en la modulación por  $\text{Ca}^{2+}$  de un nAChR.

En resumen nuestros resultados nos permiten concluir que, contrario con nuestra hipótesis original, la subunidad  $\alpha 9$  cumple un rol fundamental en la potenciación por  $\text{Ca}^{2+}$ , muy posiblemente uniendo  $\text{Ca}^{2+}$  a un sitio que involucra su E175. Por otro lado, los dominios extracelulares de  $\alpha 10$  contienen determinantes estructurales indispensables para que ocurra la potenciación en el receptor  $\alpha 9\alpha 10$ , posiblemente aportando los E45 a las interfaces de unión que involucran los E175 de  $\alpha 9$ . Finalmente, contrario a lo observado para  $\alpha 9$  y a lo reportado para  $\alpha 7$ , el E175 de  $\alpha 10$  está relacionado con el bloqueo en lugar de la potenciación. En el futuro, la caracterización y modelado del sitio constituido posiblemente en la interfaz entre dos subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  adyacentes,



exponiendo sus E175 y E45 respectivamente, puede llevar al diseño de potenciadores alostéricos de utilidad terapéutica para prevenir el trauma acústico.

### Capítulo 3.

Modulación positiva del receptor nicotínico  $\alpha 9\alpha 10$  de rata recombinantes por ácido ascórbico.

La exposición a altas intensidades de sonido tiene un detrimento sustancial y creciente sobre la salud en países industrializados, causando pérdida de audición y tinnitus (Vio and Holme, 2005). Este problema ha impulsado la búsqueda de fármacos y terapias potenciales para prevenir el trauma acústico (Lynch and Kil, 2005).

La actividad de fibras eferentes inhibitorias que se proyectan desde el tallo encefálico hasta las células ciliadas de la cóclea puede disminuir el trauma acústico (Maison *et al.*, 2002; Taranda *et al.*, 2009). Este control inhibitorio de la función auditiva está mediado por el nAChR  $\alpha 9\alpha 10$ , el cual está acoplado a canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  extracelular del tipo SK2, ambos presentes en la membrana post-sináptica de las células ciliadas (Elgoyhen and Katz, 2012). En consecuencia, potenciar las respuestas mediadas por  $\alpha 9\alpha 10$  empleando un fármaco modulador positivo del receptor podría tener un uso potencial en la prevención o tratamiento de la pérdida de audición por trauma acústico (Elgoyhen *et al.*, 2009).

A pesar del amplio número de antagonistas conocidos para el receptor  $\alpha 9\alpha 10$ , hasta ahora solo se ha documentado un potenciador farmacológico, la rianodina (Zorrilla de San Martín *et al.*, 2007), la cual no es adecuada para una terapia farmacológica. En consecuencia, encontrar nuevos moduladores positivos para  $\alpha 9\alpha 10$ , que puedan ser usados clínicamente, representaría un adelanto significativo.

Muchas de las drogas que han demostrado tener un efecto otoprotector son antioxidantes o están relacionadas con reacciones metabólicas antioxidantes (Lynch and Kil, 2005). Particularmente, se ha demostrado que el ácido ascórbico (Vitamina C, ASC) puede prevenir el trauma acústico en coballos (McFadden *et al.*, 2005), sin embargo el mecanismo subyacente no está completamente elucidado. Existe evidencia sugiriendo que compuestos antioxidantes neutralizarían los radicales libres producidos durante la exposición al trauma acústico (Heinrich *et al.*, 2008; Le Prell *et al.*, 2007), sin embargo esto no excluye otros posibles mecanismos para el efecto otoprotector.

El ASC es un antioxidante endógeno que se encuentra en concentraciones de  $\sim 0,05$  mM en plasma (Evans *et al.*, 1982),  $\sim 0,2$  mM en el líquido cefaloraquídeo (Miele and Fillenz, 1996; Reiber *et al.*, 1993) y  $\sim 1$  mM en cerebro (Harrison and May, 2009;

Spector, 2009). Sin embargo, en algunos tejidos como la retina puede alcanzar concentraciones 100 veces más elevadas que en plasma (Hediger, 2002; Rose and Bode, 1991). En algunos tipos celulares también se encuentran concentraciones mucho mayores que en plasma. Por ejemplo, en las células sanguíneas alcanza concentraciones de ~3 mM (Evans *et al.*, 1982) y en neuronas ~10 mM (Rice and Russo-Menna, 1998).

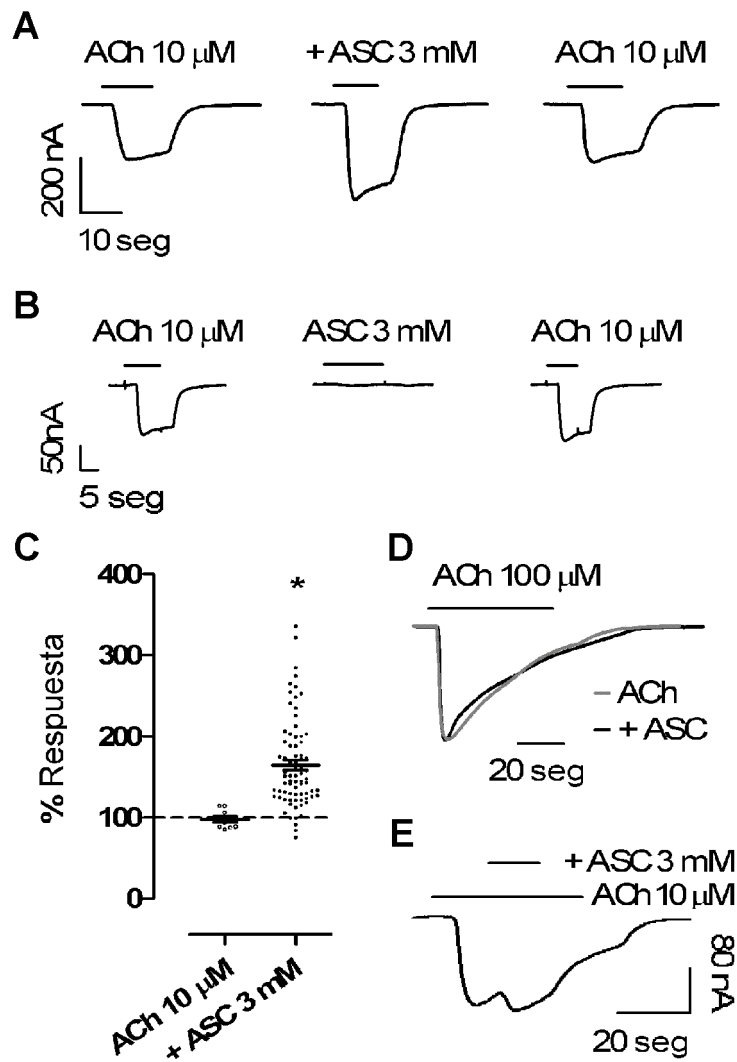
A nivel extracelular, la concentración de ASC puede aumentar sustancialmente en forma transitoria en respuesta a la actividad neuronal (Bigelow *et al.*, 1984; Grunewald, 1993; Portugal *et al.*, 2009; Rebec and Pierce, 1994). Se ha demostrado que el ASC extracelular puede modular la actividad de varios canales iónicos, como receptores de glutamato tipo NMDA y canales de Ca<sup>2+</sup> tipo T (Majewska *et al.*, 1990; Nelson *et al.*, 2007). Sin embargo, en estos canales iónicos, el ASC reduce sus respuestas. Por otro lado, también se ha demostrado que el ASC modula receptores ionotrópicos de GABA, en este caso de manera positiva (Calero *et al.*, 2011). Esto es interesante ya que los receptores ionotrópicos de GABA pertenecen a la misma superfamilia de proteínas que los nAChRs y por lo tanto presentarían algún grado de similitud estructural. En esta sección se analizará el efecto del ASC sobre los nAChRs  $\alpha 7$ ,  $\alpha 4\beta 2$  y  $\alpha 9\alpha 10$ .

### 3.1) Efecto del ASC sobre las respuestas a ACh en receptores $\alpha 9\alpha 10$ recombinantes.

Determinamos si el ASC tiene un efecto o no sobre las respuestas a ACh en oocitos que expresan  $\alpha 9\alpha 10$  co-aplicándolo con el agonista. La figura 31A muestra respuestas representativas evocadas por ACh a la concentración de la EC<sub>50</sub> reportada para el receptor (10  $\mu$ M, (Elgoyhen *et al.*, 2001)) en oocitos que expresan receptores  $\alpha 9\alpha 10$  de rata. La co-aplicación de ASC en concentración 3 mM potenció las respuestas a ACh. La potenciación fue reversible ya que la amplitud de las respuestas control iniciales (previas a la co-aplicación) se recuperaron luego de lavar el oocito durante 3 min con solución de Ringer. La aplicación de ASC 3 mM no tuvo un efecto *per se* en oocitos que expresan  $\alpha 9\alpha 10$  (Fig. 31B).

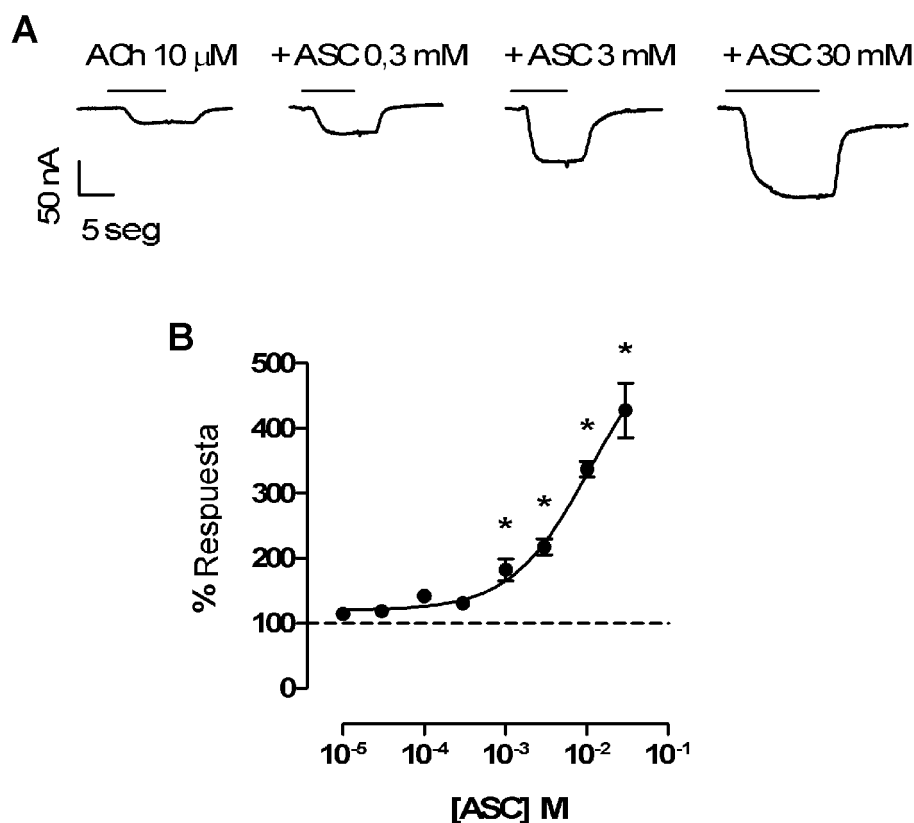
La figura 31C muestra la población de valores obtenida al cuantificar la potenciación de las respuestas a 10  $\mu$ M ACh producida por la co-aplicación de ASC 3 mM en 77 oocitos, demostrando que el efecto observado es muy variable. Esta variabilidad no se correlaciona con los niveles de expresión del receptor en los oocitos ( $p = 0,1139$  test de Pearson).

La magnitud promedio de la potenciación observada ante la co-aplicación de ASC 3 mM, expresada como el porcentaje de la amplitud de respuesta evocada por ACh 10  $\mu$ M, fue de  $165 \pm 6\%$  ( $n = 77$ , 8 ranas). La cinética de decaimiento de las respuestas ante una aplicación de 1 min de ACh 100  $\mu$ M no se alteró ante la co-aplicación de ASC 3 mM. Con el fin de cuantificar la desensibilización calculamos la relación entre las amplitudes de la corriente a los 20 seg de haber alcanzado el máximo de respuesta ( $I_{20}$ ) y la amplitud máxima de la misma ( $I_{20}/I_{\text{máx}}$  control:  $66 \pm 8\%$ ; + ASC:  $60 \pm 10\%$ ,  $n = 4$ , 2 ranas,  $p = 0,99$  Mann Whitney) (Fig. 31D). El efecto potenciador del ASC no solo se evidenció ante su co-aplicación con ACh sino que también cuando la droga se aplicó durante una respuesta a ACh (Fig. 31E), aunque la desensibilización de la respuesta a ACh no nos permitió cuantificar el efecto con precisión en este tipo de experimento.



**Figura 31:** A) Respuestas representativas ( $n = 77$  oocitos, 8 ranas) evocadas por ACh  $10 \mu\text{M}$  (panel izquierdo), ACh  $10 \mu\text{M}$  co-aplicada con ASC  $3 \text{ mM}$  (en el mismo oocito luego de  $3 \text{ min}$  de lavado con solución de Ringer, panel central) y nuevamente ACh  $10 \mu\text{M}$  luego de lavar el ASC  $3 \text{ min}$  (panel derecho) en oocitos que expresan el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  de rata. B) Respuestas representativas ( $n = 3$ , 2 ranas) evocadas por ACh  $10 \mu\text{M}$  (panel izquierdo), ASC  $3 \text{ mM}$  (panel central) y nuevamente ACh  $10 \mu\text{M}$  (panel derecho), registradas todas en un mismo oocito, realizando  $3 \text{ min}$  de lavado entre aplicaciones con solución de Ringer. C) Nube de puntos mostrando la variabilidad experimental en las respuestas a la aplicación de ACh  $10 \mu\text{M}$  ( $n = 10$ , 2 ranas) y ACh  $10 \mu\text{M}$  co-aplicada con ASC  $3 \text{ mM}$  ( $n = 77$ , 8 ranas). Se graficó las amplitudes de corriente, expresadas como el porcentaje de la amplitud máxima de la respuesta evocada por ACh  $10 \mu\text{M}$ . Se muestra la media y el error estándar para cada grupo en líneas negras; \* = significativamente distinto del control,  $p < 0,0001$  Mann Whitney. D) Respuestas representativas ( $n = 4$  repeticiones, 2 ranas) normalizadas a la misma amplitud, evocadas ante una aplicación de ACh  $100 \mu\text{M}$  sola o co-aplicada con ASC  $3 \text{ mM}$  durante  $1 \text{ min}$ . E) Respuesta representativa ( $n = 3$ , 2 ranas) evocada ante una aplicación de ACh  $10 \mu\text{M}$  con una co-aplicación de ASC  $3 \text{ mM}$  durante la fase de desensibilización de la respuesta a ACh.

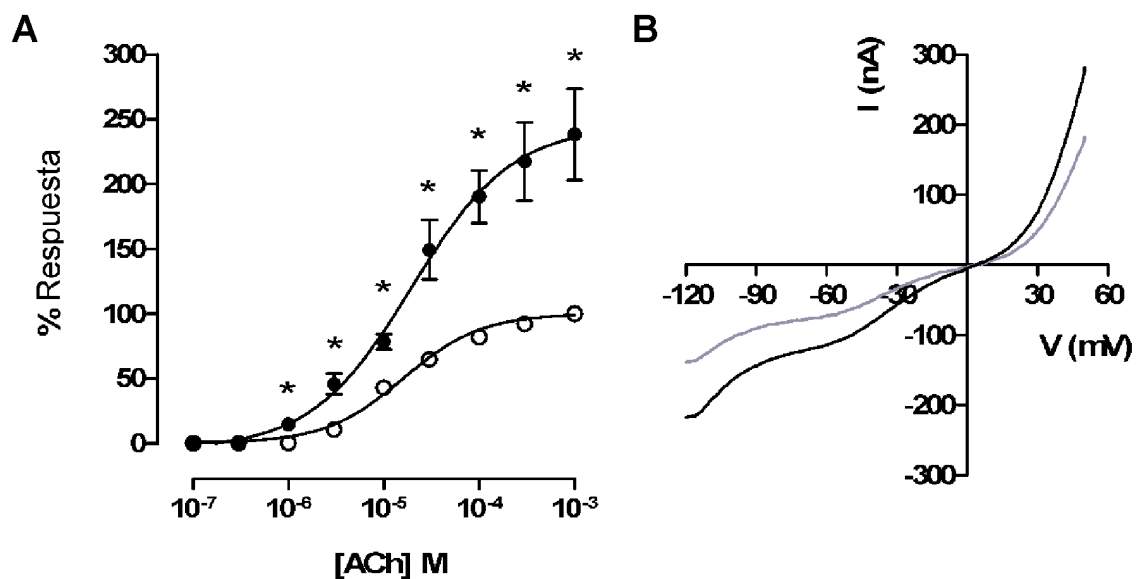
El efecto del ASC sobre las corrientes evocadas por ACh fue concentración-dependiente (Fig. 32A). La figura 32B muestra una curva concentración-respuesta para la potenciación producida por el ASC sobre las respuestas evocadas por ACh  $10 \mu\text{M}$  ( $n = 4-13$  por punto, 4 ranas) en oocitos que expresaban  $\alpha 9\alpha 10$ . El efecto potenciador fue significativo a partir de una concentración  $1 \text{ mM}$  de ASC y no saturó a la concentración más alta de ASC aplicada ( $30 \text{ mM}$ ). Para descartar un posible efecto osmótico al aplicar concentraciones altas de ASC, aplicamos ASC a concentraciones  $3$ ,  $10$  y  $30 \text{ mM}$  (sin co-aplicar ACh) y no observamos ningún efecto sobre las corrientes de fuga ( $n = 3$ , 1 rana). Más aún, la aplicación de soluciones de sacarosa iso-osmóticas a las soluciones  $3$ ,  $10$  y  $30 \text{ mM}$  de ASC tampoco produjo efecto alguno *per se*, ni potenció las respuestas a ACh ( $n = 3$ , 1 rana, datos no mostrados).



**Figura 32:** A) Respuestas representativas evocadas en un oocito que expresa  $\alpha 9\alpha 10$ , ante la aplicación de ACh 10  $\mu$ M sola y co-aplicada con ASC 300  $\mu$ M, 3 mM ó 30 mM. Se realizaron 3 min de lavado entre aplicaciones con solución de Ringer y se aplicó ACh sola entre las co-aplicaciones de ASC para controlar que el efecto potenciador se haya lavado completamente antes de la siguiente aplicación. B) Curva concentración-respuesta construida realizando co-aplicaciones de ACh 10  $\mu$ M y concentraciones crecientes de ASC de la manera expuesta en A). Se graficaron las amplitudes de corriente máxima de la respuesta, normalizadas a la respuesta máxima evocada por ACh 10  $\mu$ M en ausencia de ASC. Se graficó la media y el error estándar de 4 a 13 repeticiones por punto, usando oocitos provenientes de cuatro ranas; \* = significativamente diferente del control,  $p < 0,05$  Mann Whitney.

Para caracterizar en más profundidad el efecto del ASC, construimos curvas concentración-respuesta para ACh en presencia o ausencia de ASC 3 mM. Como se muestra en la figura 33A la presencia de ASC produjo un aumento significativo en la amplitud de respuesta máxima evocada por ACh (porcentaje de la respuesta máxima a ACh,  $240 \pm 20\%$ ,  $n = 6$ , 3 ranas,  $p = 0,0313$  Mann Whitney). Sin embargo, el ASC no produjo ningún cambio en la  $EC_{50}$  de ACh (control,  $16 \pm 1 \mu$ M; ASC 3 mM,  $18 \pm 1 \mu$ M;  $n = 5-12$ , 3 ranas,  $p = 0,3198$  t-student) ni en el coeficiente de Hill (control,  $1,05 \pm 0,05$ ; ASC 3 mM,  $0,8 \pm 0,1$ ;  $n = 5-12$ , 3 ranas,  $p = 0,0765$  t-student).

El efecto del ASC no fue dependiente del voltaje Fig. 33B. En consecuencia la potenciación se evidenció a potenciales despolarizados (porcentaje de la respuesta a ACh a +40 mV:  $130 \pm 14\%$ ,  $n = 10$ , 2 ranas) e hiperpolarizados (porcentaje de la respuesta a ACh a -90 mV:  $137 \pm 10\%$ ,  $n = 10$ , 2 ranas). El ASC no afectó el potencial de reversión del receptor (control:  $-5 \pm 2$  mV; 3 mM ASC,  $-7 \pm 3$  mV,  $n = 10$ , 2 ranas,  $p = 0,4508$  t-student).



**Figura 33:** A) Curvas concentración-respuesta para ACh construidas en presencia (●) o ausencia (○) de ASC 3 mM. Las amplitudes de corriente máxima de las respuestas se normalizaron a la respuesta máxima evocada por ACh 1 mM. Se graficó la media y el error estándar de 5 a 12 repeticiones por punto, usando oocitos provenientes de tres ranas; \* = significativamente diferente del control,  $p < 0,05$  Mann Whitney. B) Curvas I-V representativas ( $n = 10$ , 2 ranas) obtenidas en presencia de 10  $\mu$ M ACh sola (gris) o co-aplicada con ASC 3 mM (negra). Se aplicó una rampa de potencial desde -120 a +50 mV durante 2 seg en la fase estacionaria (amplitud de corriente estable en el tiempo) de respuestas a ACh 10  $\mu$ M en oocitos que expresan  $\alpha 9\alpha 10$  fijados a un potencial de membrana de -70 mV. Se corrigió la corriente de fuga en las curvas sustrayendo la respuesta a la misma rampa de voltaje obtenida en ausencia de ACh.

El ASC tiene dos hidroxilos que pueden deprotonarse en solución, uno con un pKa de 4,1 y el otro con un pKa de 11,6. Como la diferencia entre los pKa es más de 4 podría considerarse que las dos variantes de deprotonación no coexistirían en solución a un determinado pH. Entonces, al pH 7,2 de la solución de Ringer normal, de acuerdo a la ecuación de Henderson:

$$pH = pKa + \log_{10} \left( \frac{\text{Ascorbato}^-}{\text{ASC}} \right)$$

habría ~1260 veces más ASC deprotonado (ascorbato<sup>-</sup>) que ASC sin deprotonar. Es decir que en una solución de ASC 3 mM a pH 7,2 la concentración de ascorbato sería ~2,998 mM y la de ASC ~2,38 μM. Sin embargo, al ser un antioxidante, el ASC en solución y en contacto con O<sub>2</sub> y la luz se oxida, convirtiéndose en dehidroascorbato (DHA). Por ende, en una solución de ASC en solución de Ringer a pH 7,2 habría como mínimo tres especies diferentes: ASC, ascorbato y DHA.

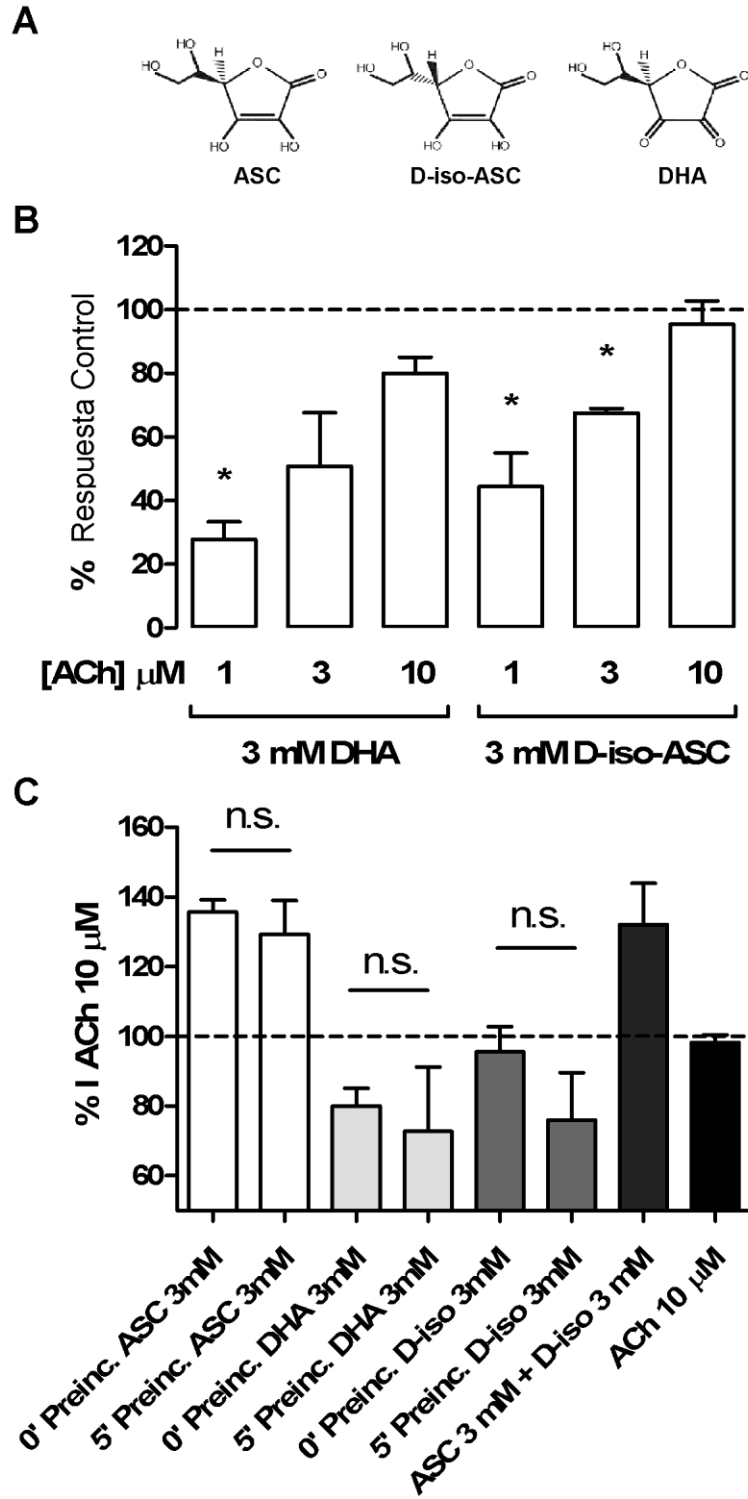
Para estudiar la especificidad del efecto observado al co-aplicar una solución de ASC junto con ACh, probamos el efecto de dos análogos estructuralmente relacionados: el DHA (el cual no es reductor) y el ácido D-iso-ascórbico (D-iso-ASC), un estereoisómero con igual capacidad reductora que el ASC (Fig. 34A). No observamos efecto sobre las corrientes evocadas por ACh 10 μM ante la co-aplicación de DHA 3 mM o de D-iso-ASC 3 mM. Más aún, a concentraciones de ACh menores a 10 μM, la co-aplicación de estos compuestos inhibió las respuestas (Fig. 34B). La preincubación durante 5 min con ASC, DHA o D-iso-ASC 3 mM produjo un efecto similar al descrito cuando los compuestos fueron co-aplicados con ACh (Fig. 34C).

Dado que el ASC y el D-iso-ASC son moléculas casi idénticas (solo difieren en la orientación de un carbono quiral) decidimos determinar si la presencia de D-iso-ASC afecta el efecto del ASC. Para ello co-aplicamos ASC 3 mM y D-iso-ASC 3 mM junto con ACh a una concentración a la cual el D-iso-ASC no tuvo un efecto per se (10 μM, Fig. 34C). La potenciación por ASC no fue significativamente diferente en presencia de D-iso-ASC (porcentaje de la respuesta a ACh 10 μM: ASC 3 mM = 131 ± 8%; + D-iso-ASC 3 mM = 130 ± 11%; n = 6, 3 ranas, p = 0,8182 Mann Whitney), indicando que esta concentración de D-iso-ASC no bloqueó el efecto del ASC.

En conjunto, estos resultados sugieren que el efecto potenciador del ASC no es causado por el posible DHA presente en las soluciones de ASC a pH 7,2. Esto implica que la capacidad reductora del ASC en solución podría ser necesaria para producir la potenciación. Alternativamente o en adición a un mecanismo redox como el mencionado, los hidroxilos presentes en las formas reducidas de ASC en solución podrían participar de una interacción específica con algún sitio de unión en el receptor, causando así la potenciación. Por otro lado, la potenciación es estereoespecífica ya que



el estereoisómero D-iso-ASC con igual potencial reductor que el ASC, no produce potenciación. Esto refuerza nuestra hipótesis de la unión del ASC a un sitio específico en el receptor.



**Figura 34:** A) Estructura química del L-ácido ascórbico (ASC), ácido D-iso-ascórbico (D-iso-ASC) y ácido L-dehidroascórbico (DHA). B) Cuantificación del efecto de DHA o D-iso-ASC 3 mM. Las amplitudes de corriente máximas a ACh en presencia de los compuestos se expresan como el porcentaje del respectivo valor control ante la aplicación de ACh. Se muestra la media y el error estándar de 3 a 8 réplicas por columna empleando oocitos de dos ranas; \* = significativamente distinto del control,  $p < 0,05$  Mann Whitney. C) Comparación del efecto de la co-aplicación de ACh 10  $\mu$ M junto con ASC, DHA o D-iso-ASC con una preincubación previa de las drogas durante 5 min (5' Preinc.) o sin preincubar (0' Preinc.). Las amplitudes de corriente máximas se expresan como el porcentaje del valor control generado por la aplicación de ACh 10  $\mu$ M sola; n.s. = no significativamente diferentes entre sí,  $p > 0,05$  Mann Whitney. En la penúltima columna se cuantifica el efecto de la co-aplicación de ACh 10  $\mu$ M junto con ASC 3 mM y D-iso-ASC 3 mM.

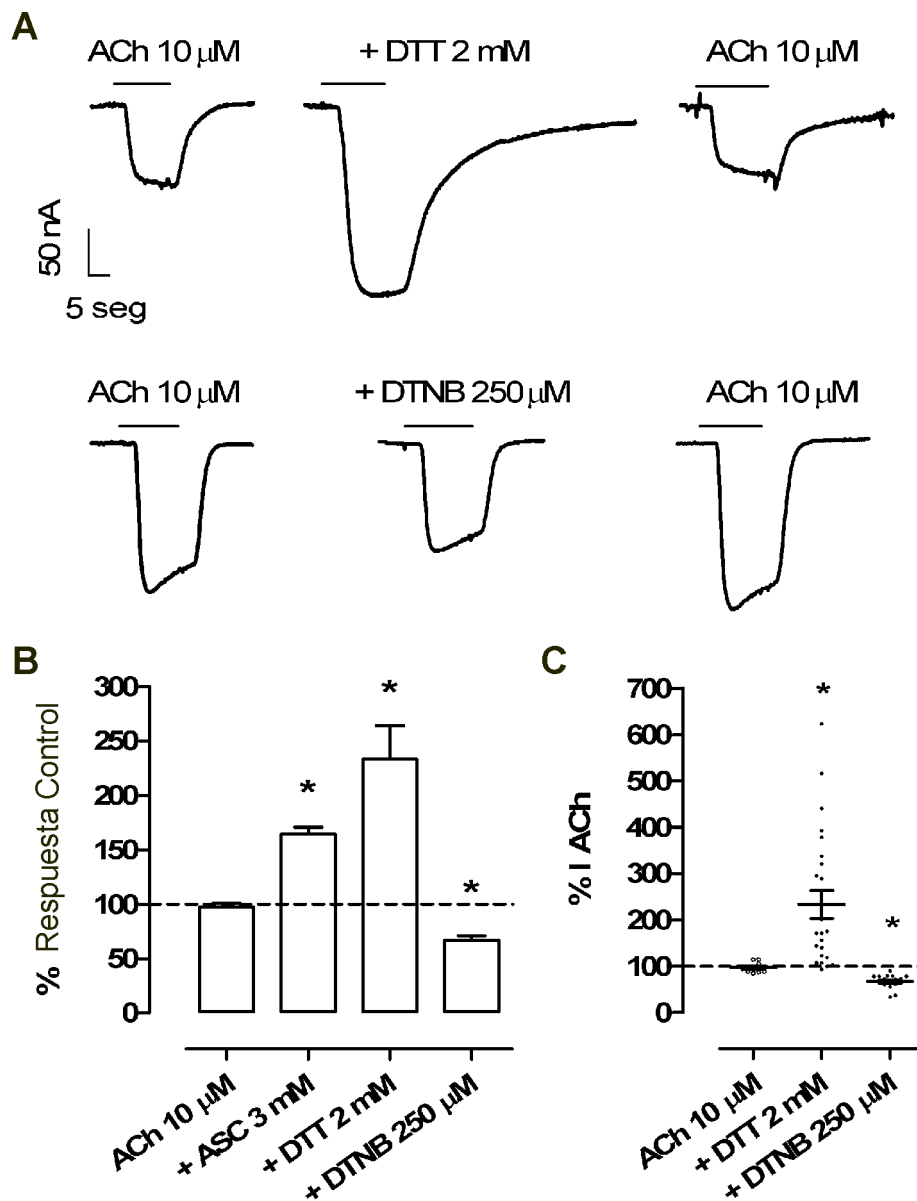
En conclusión, nuestros resultados demuestran que el ASC en solución a pH 7,2 tiene un efecto potenciador sobre las corrientes evocadas por ACh en oocitos que expresan receptores  $\alpha 9\alpha 10$  de rata. Este efecto es estereoespecífico y sería causado por las formas reductoras del ASC en solución (ASC y/o ascorbato). Esto sugiere un mecanismo que implica una interacción estereoespecífica que involucre los hidroxilos (protonados o no) del ASC en solución lo cual podría deberse a un mecanismo potenciador de tipo alostérico y/o a una posible reducción sitio específica del receptor. En los siguientes apartados analizamos estas dos posibilidades.

### 3.2) Efecto de agentes redox sobre las respuestas a ACh en receptores $\alpha 9\alpha 10$ recombinantes.

Intentamos explorar en más profundidad el mecanismo de la potenciación producido por el ASC determinando si el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  es sensible a una modulación por agentes reductores u oxidantes. Esos experimentos nos permitirían inferir si la capacidad reductora del ASC cumpliría o no un rol en el mecanismo de potenciación.

La co-aplicación del agente reductor ditioneitol (DTT) 2 mM potenció las respuestas del receptor  $\alpha 9\alpha 10$  a ACh 10  $\mu$ M (porcentaje de la respuesta control:  $230 \pm 30\%$ ,  $n = 24$ , 4 ranas). En contraste, la co-aplicación de ACh 10  $\mu$ M junto con el agente oxidante ácido (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)) (DTNB) 250  $\mu$ M inhibió la respuesta (porcentaje de inhibición:  $33 \pm 4\%$ ,  $n = 17$ , 3 ranas). La figura 35A muestra trazos representativos de estos experimentos y la figura 35B su cuantificación. La potenciación observada por DTT fue muy variable, de modo similar a lo observado para ASC. En

cambio, la inhibición por DTNB fue reproducible (Fig. 35C). Los efectos del DTT y el DTNB fueron reversibles ya que las amplitudes de respuesta control a ACh se recuperaron luego de lavar los oocitos durante 3 min con solución de Ringer. Ninguno de los dos compuestos evocó respuestas *per se* en oocitos inyectados con  $\alpha 9\alpha 10$  (datos no mostrados). En conjunto, estos resultados sugieren que el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  es sensible a una modulación por agentes redox y por lo tanto es posible que la capacidad reductora del ASC cumpla un rol en su mecanismo de potenciación.



**Figura 35:** A) Respuestas representativas evocadas ante la co-aplicación de ACh 10  $\mu\text{M}$  y DTT 2 mM (panel superior, n = 24, 4 ranas) o DTNB 250  $\mu\text{M}$  (panel inferior, n = 17, 3 ranas). B) Cuantificación de

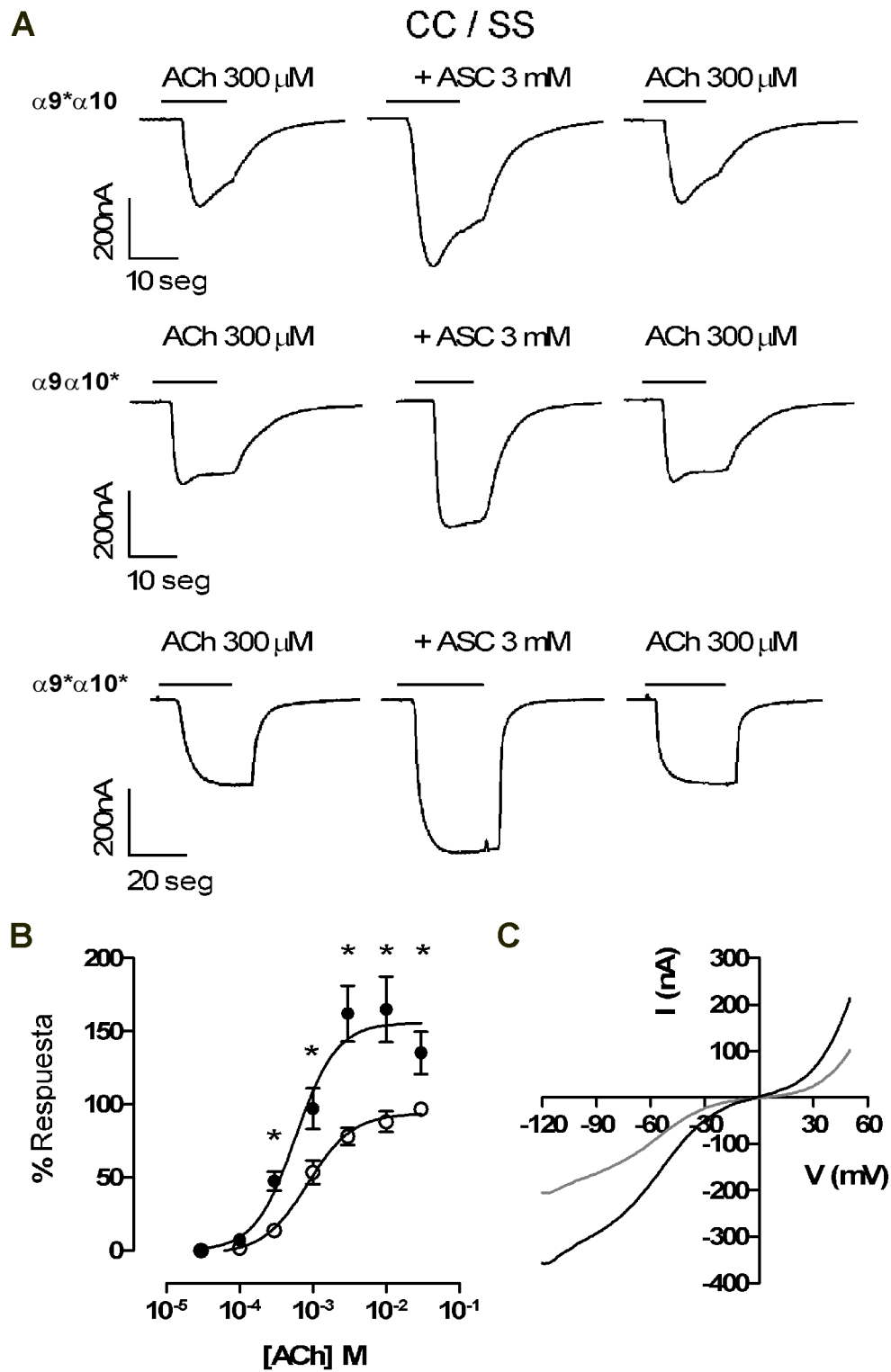
los efectos de DTT y DTNB sobre las respuestas a ACh 10  $\mu$ M del receptor  $\alpha 9\alpha 10$ . Se incluyó el efecto del ASC como punto de comparación. Las amplitudes de corriente máxima de las respuestas se normalizaron a la amplitud máxima de la respuesta evocada por ACh 10  $\mu$ M. Se graficó la media y el error estándar de 6 a 24 repeticiones por grupo usando oocitos de al menos dos ranas; \* =  $p < 0,05$  Mann Whitney. C) Nube de puntos mostrando la variabilidad experimental de las respuestas a la aplicación de ACh 10  $\mu$ M (n = 10, 2 ranas), co-aplicada con DTT 2 mM (n = 24, 4 ranas) o DTNB 250  $\mu$ M (n = 17, 3 ranas). Se graficó las amplitudes de corriente máxima de las respuestas, expresadas como el porcentaje de la amplitud máxima de la respuesta control evocada por ACh 10  $\mu$ M. Se muestra la media y el error estándar para cada grupo con líneas negras; \*,  $p < 0,05$  Mann Whitney.

Los residuos cisteína (Cys) pueden estar sujetos a modificaciones redox rápidas y reversibles en condiciones fisiológicas, lo que las hace el blanco más probable para un mecanismo de modulación redox (Klomsiri *et al.*, 2011). Más aún, existe evidencia que sugiere que el ASC es capaz de reducir puentes disulfuro *in vitro* (Landino *et al.*, 2006). Las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  tienen cuatro residuos Cys extracelulares conservados. Dos de ellas son consecutivas (C192 y C193, numeración de la subunidad  $\alpha 1$  de *Torpedo marmorata*), forman un puente disulfuro (Kao and Karlin, 1986) y son características del loop C de las subunidades  $\alpha$  nicotínicas que conforman el componente principal del sitio de unión a ACh. Las dos restantes forman el puente disulfuro del Cys-loop que caracteriza a la familia de proteínas (C128 y C142, numeración de  $\alpha 1$  de *T. marmorata*).

Para determinar si las Cys extracelulares de  $\alpha 9\alpha 10$  son responsables del efecto del ASC, al menos en parte, analizamos el efecto del ASC en oocitos que expresan subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  con las Cys consecutivas del loop C sustituidas por serina (Ser). Los receptores mutantes  $\alpha 9CC192/193SS\alpha 10CC192/193SS$  (de ahora en más CC/SS) respondieron a ACh con una  $EC_{50}$  de  $983 \pm 84 \mu M$  y un coeficiente de Hill de  $1,1 \pm 0,2$  (n = 7, 3 ranas) y sus respuestas a ACh fueron potenciadas por ASC (Fig. 36).

Como se muestra en la figura 36A y B, y como se observó previamente en receptores salvajes (WT), la presencia de ASC 3 mM produjo un aumento significativo en la amplitud máxima evocada por ACh de los receptores mutantes (porcentaje de respuesta máxima,  $160 \pm 10\%$ , n = 6, 3 ranas,  $p = 0,0313$  Mann Whitney) y no cambió su  $EC_{50}$  ( $798 \pm 44 \mu M$ , n = 6, 3 ranas,  $p = 0,2833$  t-student) ni coeficiente de Hill ( $1,2 \pm 0,2$ , n = 6, 3 ranas,  $p = 9428$  t-student). La potenciación observada tampoco fue dependiente de voltaje (Fig. 36C). Se observó potenciación tanto a potenciales despolarizados (porcentaje de respuesta a ACh a +40mV:  $160 \pm 20\%$ , n = 6, 2 ranas) como hiperpolarizados (porcentaje de respuesta a ACh a -90mV:  $155 \pm 16\%$ , n = 6, 2

ranas) y no hubo un cambio significativo en el potencial de reversión (control:  $-8 \pm 2$  mV; 3 mM ASC,  $-13 \pm 3$  mV,  $n = 6$ , 2 ranas,  $p = 0,4475$  t-student).



**Figura 36:** A) Respuestas representativas evocadas por ACh sola, co-aplicada con ASC 3 mM y nuevamente ACh sola, en oocitos que expresan receptores  $\alpha 9\alpha 10$  con una o ambas subunidades portadoras de la mutación CC/SS (n = 6, 3 ranas). Los tiempos entre aplicaciones fueron de 3 min. B) Curvas concentración-respuesta para ACh en presencia (●) o ausencia (○) de ASC 3 mM, construidas en oocitos que expresan subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  con la mutación CC/SS. Las amplitudes de corriente máxima de las respuestas se normalizaron a la respuesta máxima a ACh. Se graficó la media y el error estándar de 6 a 7 experimentos por punto, usando oocitos provenientes de tres ranas; \* = significativamente diferente del control,  $p < 0,05$  Mann Whitney. C) Curvas I-V representativas (n = 6, 2 ranas) obtenidas en presencia de ACh 1 mM sola (gris) o co-aplicada con ASC 3 mM (negra). Se aplicó una rampa de potencial desde -120 a +50 mV en 2 seg en la fase estacionaria (amplitud de corriente estable en el tiempo) de respuestas a ACh 1 mM evocadas en oocitos que expresan el receptor  $\alpha 9\alpha 10$ , fijados a un potencial de membrana de -70 mV. Se corrigió la corriente de fuga en las curvas sustrayendo la respuesta a la misma rampa de voltaje obtenida previamente a la aplicación de ACh.

Estos resultados descartarían un efecto directo del ASC sobre las Cys contiguas del loop C en el mecanismo de potenciación.

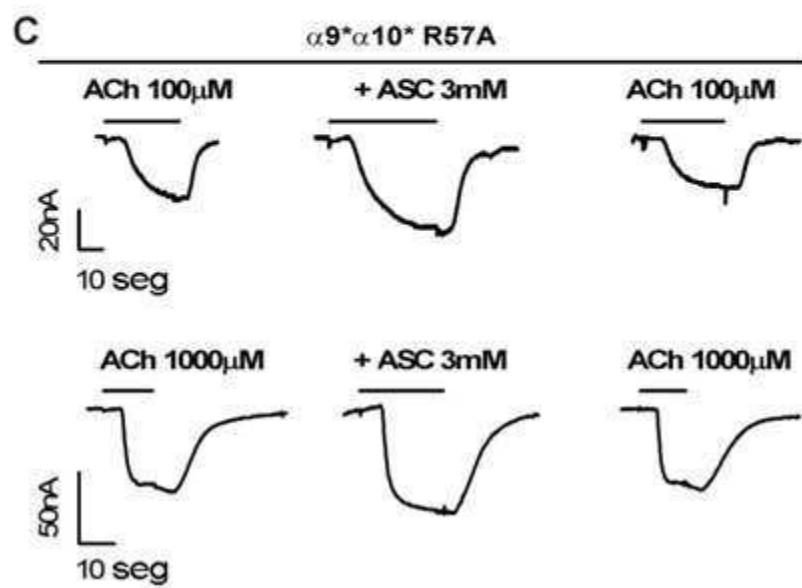
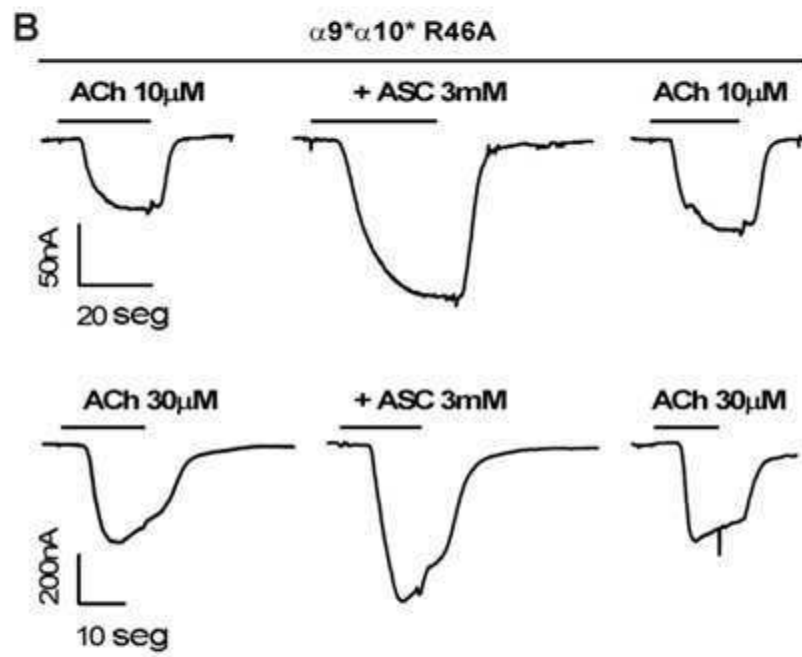
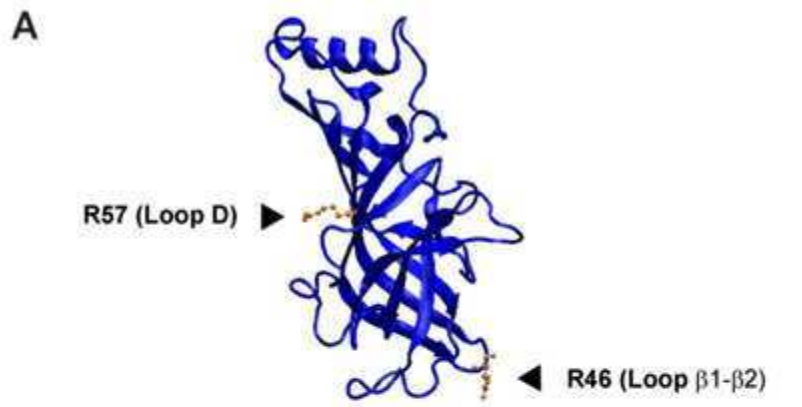
Existe evidencia demostrando que mutaciones en las Cys que forman el puente disulfuro del Cys-loop generan receptores no funcionales o que no se expresan en oocitos de *X. laevis* (Dunckley *et al.*, 2003). Por lo tanto, consideramos que mutar esos residuos no sería una opción viable y no pudimos determinar la posible participación de esos residuos en el mecanismo de potenciación del ASC.

### 3.3) Contribución de residuos arginina extracelulares al mecanismo de potenciación por ASC.

El sitio de interacción para el ASC ha sido caracterizado para algunas reductasas, enzimas para las cuales es un cofactor (Burmeister *et al.*, 2000; Mishra *et al.*, 2009; Pande and Myer, 1980; Sharp *et al.*, 2003). En todas ellas, el ASC interactúa directamente con residuos arginina (Arg). En consecuencia, consideramos a los residuos Arg extracelulares en las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  como posibles sitios de interacción candidatos. Para acotar el número de candidatos nos centramos en aquellas Arg extracelulares presentes en, o cerca de, dominios del receptor relacionados con el “gating” del canal (Bartos *et al.*, 2009). Con este fin, construimos modelos estructurales de homología *in silico* para el dominio extracelular del receptor  $\alpha 9\alpha 10$ , considerando la estequiometría conocida  $(\alpha 9)_2(\alpha 10)_3$  (Plazas *et al.*, 2005b) y un orden alternado de subunidades en el pentámero, empleando como templatado la forma apo de la AChBP de

*Aplysia californica* (2W8E.pdb). De todas las Arg extracelulares presentes en  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  nos enfocamos en dos (Fig. 37A), una de ellas cerca del sitio de unión a ACh en el loop D (R57, numeración de  $\alpha 1$  de *T. marmorata*), y otra en el loop  $\beta 1$ - $\beta 2$  (R46).

Para estudiar la influencia de estos residuos en la potenciación por ASC, los sustituimos por alanina (Ala). La figura 37B muestra que la co-aplicación de ASC 3 mM potencia las corrientes evocadas por dos concentraciones de ACh en receptores  $\alpha 9\alpha 10$  con la sustitución R46A en ambas subunidades (porcentaje de la respuesta evocada por ACh 10  $\mu$ M,  $179 \pm 9\%$ ,  $n = 7$ , 3 ranas). La mutación R57A produjo resultados similares (Fig. 37C, porcentaje de la respuesta evocada por ACh 100  $\mu$ M,  $152 \pm 5\%$ ,  $n = 4$ , 2 ranas). En conclusión, estos resultados descartarían que estos residuos estén involucrados en el mecanismo de potenciación por ASC.





**Figura 37:** A) Diagrama de cintas de un modelo de homología de la estructura del dominio extracelular de la subunidad  $\alpha 9$ , mostrando residuos ARG candidatos a interactuar con ASC en el loop  $\beta 1$ - $\beta 2$  (R46) y el loop D (R57, ambos remarcados en naranja). B) Trazos representativos ( $n = 6-7$ , 3 ranas) de las respuestas evocadas ante la co-aplicación de distintas concentraciones de ACh y ASC 3 mM, en oocitos que expresan receptores  $\alpha 9\alpha 10$  con ambas subunidades portadoras de la mutación R46A. C) Respuestas representativas ( $n = 4$ , 2 ranas) evocadas por la co-aplicación de ASC 3 mM y diferentes concentraciones de ACh en oocitos inyectados con subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  portadoras de la mutación R57A.

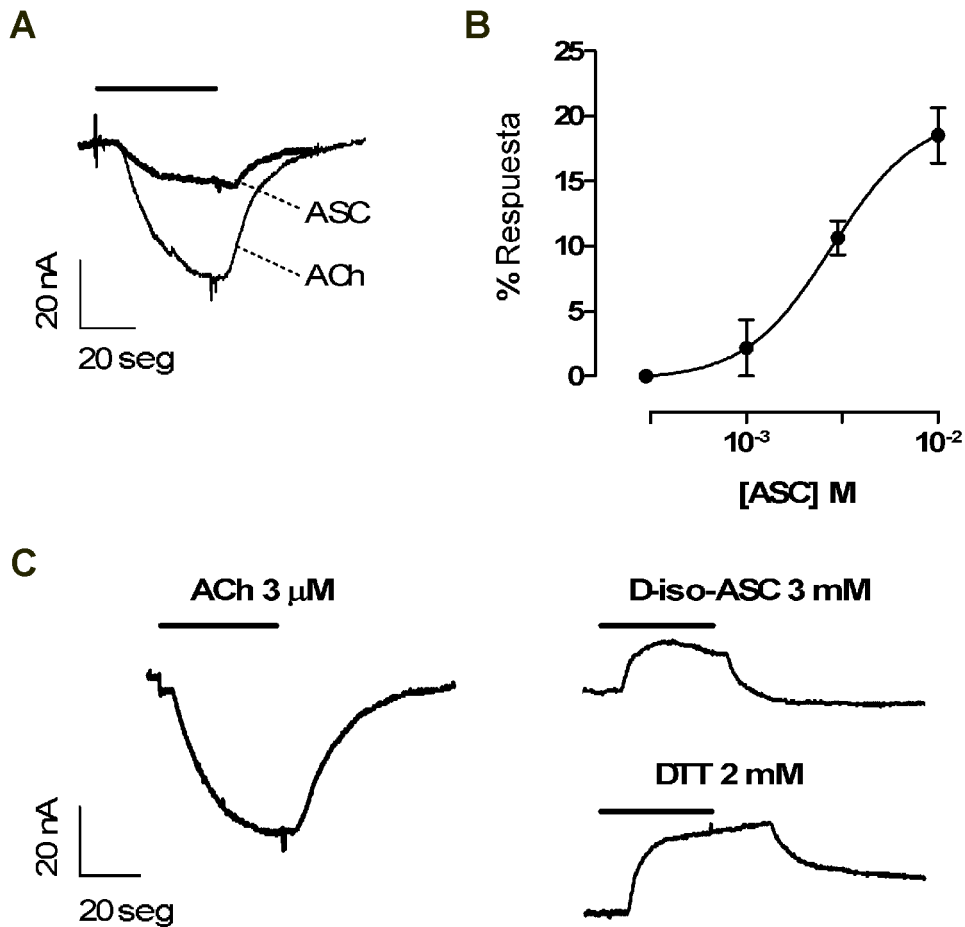
3.4) Una sustitución puntual en el poro del receptor  $\alpha 9\alpha 10$  que produce su apertura espontánea convierte al ASC en un agonista parcial.

Al no haber podido encontrar un sitio de unión para el ASC, nos preguntamos si el ASC interactuaría directamente con el receptor o si el efecto observado es inespecífico debido a, por ejemplo, una interacción con otra molécula endógena del oocito que afecte el funcionamiento del receptor, causando así la potenciación indirectamente. Se ha demostrado para el receptor  $\alpha 7$  que un modulador alostérico positivo se convierte en un agonista parcial cuando se introduce en el tramo TM2 una mutación que favorece el “gating” del canal (Filatov and White, 1995; Gill *et al.*, 2011; Labarca *et al.*, 1995). En base a este antecedente, decidimos poner a prueba si el ASC tiene un comportamiento similar. De ocurrir esto, no solo tendríamos evidencia que apoyaría un mecanismo de tipo alostérico para la potenciación por ASC del receptor  $\alpha 9\alpha 10$ , sino que también evidenciaríamos que el efecto del ASC es causado por una interacción directa con el receptor y no por un mecanismo indirecto inespecífico.

La sustitución de una valina por treonina, en el treceavo residuo del TM2 (V13'T) de  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$ , genera receptores cuyo “gating” se encuentra muy exacerbado e incluso sufren aperturas espontáneas (Plazas *et al.*, 2005a). La figura 38A muestra trazos representativos evocados por ASC 3 mM y respuestas control evocadas por una concentración saturante de ACh (3  $\mu$ M) en oocitos que expresan subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  con la sustitución V13'T. El ASC evocó corrientes entrantes de manera concentración-dependiente, con un efecto máximo del  $20 \pm 4\%$  ( $n = 5$ , 2 ranas) de la respuesta máxima evocada por ACh saturante (Fig. 38B).

Por el contrario, la aplicación de D-iso-ASC 3 mM evocó corrientes de sentido contrario cuya amplitud fue de un  $14 \pm 3\%$  ( $n = 6$ , 2 ranas) de las corrientes evocadas por ACh 3  $\mu$ M (Fig. 38C). Como ha sido descrito anteriormente para varios antagonistas (Plazas *et al.*, 2005a), las corrientes de sentido opuesto pueden atribuirse a

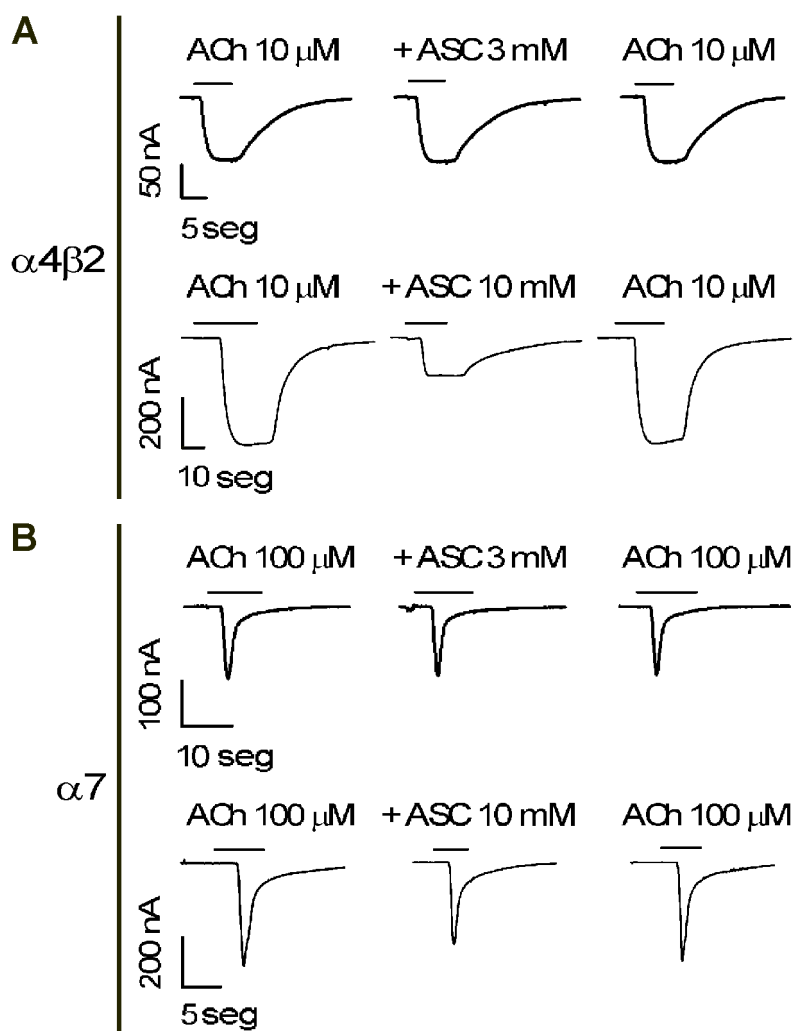
una inhibición de las aperturas espontáneas de los receptores con la sustitución V13'T, lo cual se evidencia como una reducción en la corriente de fuga. Más aún, al aplicar DTT 2 mM también observamos corrientes en sentido opuesto o reducción de la actividad espontánea (porcentaje de respuesta a ACh 3  $\mu$ M;  $23 \pm 4\%$ ,  $n = 6$ , 2 ranas). Este efecto sugiere que el DDT y el D-iso-ASC estarían actuando a través de un mecanismo diferente al del ASC.



**Figura 38:** A) Respuestas representativas evocadas por la aplicación de ASC 10 mM o ACh en concentración saturante (3  $\mu$ M), en un oocito que expresa receptores  $\alpha 9\alpha 10$  con la mutación V13'T en ambas subunidades ( $n = 5$ , 2 ranas). B) Curva concentración-respuesta para ASC construida en oocitos que expresan receptores con ambas subunidades mutantes (V13'T). Las amplitudes de corriente máxima de las respuestas se normalizaron a la respuesta evocada por ACh saturante (3  $\mu$ M). Se graficó la media y el error estándar de 5 repeticiones por punto, usando oocitos provenientes de dos ranas. C) Trazos representativos del efecto de la aplicación de D-iso-ASC 3 mM o DTT 2 mM en receptores con la mutación V13'T en ambas subunidades ( $n = 6$ , dos ranas).

### 3.5) Efecto del ASC sobre las respuestas a ACh en receptores $\alpha 7$ ó $\alpha 4\beta 2$ recombinantes.

Con el fin de determinar si el ASC también potencia otros nAChRs, analizamos su efecto en oocitos que expresan receptores  $\alpha 7$  ó  $\alpha 4\beta 2$  de rata (Fig. 39A). La co-aplicación de ASC 3 mM no modificó las respuestas evocadas por ACh en oocitos que expresan  $\alpha 4\beta 2$  (porcentaje de la respuesta a ACh 10  $\mu$ M,  $102 \pm 4\%$ , n = 15, 3 ranas) ó  $\alpha 7$  (porcentaje de la respuesta a ACh 100  $\mu$ M,  $105 \pm 4\%$ , n = 16, 3 ranas). A una concentración de 10 mM el ASC inhibió las respuestas a ACh de estos receptores (Fig. 39B). En conclusión, el ASC no tiene un efecto potenciador de las respuestas a ACh en los nAChRs  $\alpha 7$  y  $\alpha 4\beta 2$  de rata.



**Figura 39:** A) Trazos representativos (n = 15, 3 ranas) de las respuestas evocadas ante la co-aplicación de distintas concentraciones de ASC y ACh 10  $\mu$ M, en oocitos que expresan receptores  $\alpha 4\beta 2$  de rata. B)

Respuestas representativas (n = 16, 3 ranas) evocadas por la co-aplicación de ACh 100  $\mu$ M y diferentes concentraciones de ASC en oocitos que expresan el receptor  $\alpha 7$  de rata.

### 3.6) Discusión.

En este capítulo hemos determinado que el ASC, a concentraciones milimolares o superiores, potencia las corrientes evocadas por ACh en oocitos que expresan el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  de rata. Este sería el primer reporte de una potenciación por ASC de un nAChR. Si bien el ASC potencia receptores ionotrópicos de GABA (Calero *et al.*, 2011), que también pertenecen a la familia de receptores Cys-loop, esto no es un efecto general sobre todos los miembros de la familia ya que no se observa sobre los nAChRs neuronales  $\alpha 7$  y  $\alpha 4\beta 2$  de rata.

El rango de concentraciones efectivas para la potenciación producida por ASC sobre  $\alpha 9\alpha 10$  es similar al reportado en los receptores ionotrópicos de GABA (Calero *et al.*, 2011) y es cercano al rango de concentraciones de ASC en el medio extracelular de varios tejidos (Evans *et al.*, 1982; Miele and Fillenz, 1996; Reiber *et al.*, 1993; Rice and Russo-Menna, 1998). Más aún, la concentración de ASC extracelular podría aumentar en respuesta a actividad neuronal, como se ha evidenciado en el cerebro (Bigelow *et al.*, 1984; Grunewald, 1993; Portugal *et al.*, 2009; Rebec and Pierce, 1994). Aún no se han determinado las concentraciones de ASC en los fluidos cocleares o las células ciliadas, ni la expresión de transportadores de ASC en la cóclea. Sin embargo, como ha sido reportado en otros tejidos, es probable que existan concentraciones fisiológicas micro-milimolares de ASC en o alrededor de las células ciliadas. Más aún, las concentraciones de ASC podrían aumentar en condiciones patofisiológicas como el trauma acústico. La relevancia de la presencia de vitamina C en el oído interno ha sido evidenciada en ratones (Kashio *et al.*, 2009). Ratones knockout para la enzima gluconolactonasa, que participa en la síntesis de la vitamina C, tienen una pérdida de audición asociada a la edad más acelerada (Kashio *et al.*, 2009). Sin embargo cabe mencionar que los ratones y la mayoría de los mamíferos, a diferencia del humano y el cobayo, pueden sintetizar vitamina C (McFadden *et al.*, 2005).

Lo rápido del efecto del ASC y su rápida reversión sugieren que este compuesto no requiere entrar a la célula para producir la potenciación. Esto está sustentado por la falta de un efecto mayor al preincubar los oocitos con ASC. Por otro lado, los oocitos no expresan transportadores de ASC (Dyer *et al.*, 1994) y al ser el ASC una molécula

hidrofílica no puede atravesar la bicapa lipídica. En base a estas evidencias, se puede concluir que el ASC ejercería su efecto mediante un sitio de acción extracelular.

Los experimentos con DHA y D-iso-ASC indican que el efecto observado es causado por las formas reductoras del ASC en solución (ascorbato y/o ascórbico) y que es estereoespecífico. La estereoespecificidad del efecto sugiere una interacción con un sitio selectivo para el isómero L del ASC. Por lo tanto, es probable que el mecanismo de potenciación involucre ya sea un sitio de interacción estereoespecífico en el cual los hidroxilos deprotonables del ASC en su forma reducida participen de interacciones intermoleculares indispensables o que produzcan una modificación redox en el sitio específico con el cual interactúa.

Nuestros ensayos con DTT y DTNB indican que el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  puede ser modulado por agentes reductores u oxidantes específicos de residuos Cys. Una modulación similar está reportada para los receptores ionotrópicos de GABA (Amato *et al.*, 1999; Calero and Calvo, 2008; Pan *et al.*, 2000). También se ha reportado una modulación redox en diferentes nAChRs. Sin embargo, los reductores como el DTT inhiben en lugar de potenciar las respuestas a agonistas o la unión de toxinas al sitio de unión (Leprince, 1983; Stitzel *et al.*, 1988). Particularmente, la reducción por DTT seguida de alquilación de Cys con n-etilmaleimida causa una reducción en el tiempo de apertura y corrientes de canal único de nAChRs presentes en células BC3H-11 (Bouzat *et al.*, 1991).

Residuos Cys están comúnmente involucrados en modulaciones redox de varios canales iónicos (Chu *et al.*, 2006; Ruiz-Gomez *et al.*, 1991; Ruppertsberg *et al.*, 1991; Sullivan *et al.*, 1994). Si bien el ASC es capaz de reducir puentes disulfuro *in vitro* (Landino *et al.*, 2006), el ASC potenció receptores  $\alpha 9\alpha 10$  mutantes donde las dos Cys presentes en el puente disulfuro del loop C del sitio de unión fueron sustituidas por Ser, descartando un rol de una reducción por ASC de ese puente disulfuro. Sin embargo, no podemos descartar la importancia de una posible reducción por ASC del puente disulfuro del Cys-loop en el mecanismo de potenciación. Este puente disulfuro no pudo ser evaluado ya que mutaciones en sus Cys producen receptores no funcionales (Dunckley *et al.*, 2003)

Dado que el D-iso-ASC y el ASC tienen un equivalente poder reductor, pero evocaron efectos opuestos en receptores con la sustitución V13'T, podríamos sugerir que la capacidad reductora del ASC no sería tan importante para la potenciación como si lo es la estereoespecificidad. Más aún, nuestros resultados sugieren que la

potenciación por ASC y la potenciación por DTT responderían a mecanismos diferentes, ya que produjeron efectos opuestos en estos receptores mutantes.

Nuestra búsqueda de residuos candidatos a interactuar con el ASC por modelado de homología haciendo hincapié en los residuos Arg no nos permitió encontrar un sitio de interacción en el receptor. Futuros experimentos de mutagénesis dirigida en otros residuos Arg no abarcadas en este trabajo y simulaciones de “docking” *in silico* podrían ayudar a caracterizar el sitio responsable de la potenciación.

Que el ASC produzca corrientes *per se* en oocitos que expresan receptores con la mutación V13'T en ambas subunidades sugiere que el mecanismo de potenciación es el de un modulador alostérico positivo. Esta conclusión se basa en que moduladores alostéricos positivos de nAChRs, como TQS, se convierten en agonistas parciales de receptores con mutaciones que facilitan el “gating” (Bertrand *et al.*, 1992; Gill *et al.*, 2011). Los moduladores alostéricos positivos (PAMs) son compuestos que no se unen al sitio ortostérico de unión del agonista, sino que desde otro sitio, el sitio alostérico, potencian la actividad del agonista influenciando las constantes de transición entre los estados inactivo y activo del receptor (Monod *et al.*, 1965). En consecuencia, la presencia de un modulador alostérico positivo en una sinapsis no solo potenciaría las respuestas postsinápticas sino que además dejaría inafectado el funcionamiento temporalmente coordinado de la neurotransmisión. Esto los hace atractivos para fines terapéuticos frente a, por ejemplo, agonistas parciales o totales, ya que los últimos causarían la rápida desensibilización de los receptores postsinápticos.

Se han encontrado dos tipos de PAMs para nAChRs: los de Tipo 1 que principalmente incrementan la amplitud de la respuesta a agonista y los de Tipo 2 que disminuyen la desensibilización del receptor y pueden o no aumentar la amplitud de la respuesta (Arias, 2010; Bertrand and Gopalakrishnan, 2007). El ASC podría clasificarse como un PAM tipo 1, ya que no afecta la cinética de decaimiento de las corrientes macroscópicas del receptor. Sin embargo, los PAMs tipo 1 en general reducen la  $EC_{50}$  (Arias, 2010), algo que no observamos en el caso del ASC. Cabe destacar que la clasificación vigente de PAMs puede ser simplista y que podrían existir otros tipos de PAMs.

En conclusión, hemos identificado un potenciador del receptor  $\alpha 9\alpha 10$ , que muy probablemente se comporte como un PAM. Experimentos futuros, que posiblemente involucren simulaciones de “docking” *in silico* con modelos estructurales de homología

en sitios ya caracterizados para otros PAMs en otros nAChRs (Arias, 2010), ayudarán a delinear el sitio de acción del ASC en el receptor  $\alpha 9\alpha 10$ .

Finalmente, cabe destacar que el ASC es el segundo potenciador farmacológico conocido hasta el momento para  $\alpha 9\alpha 10$ , un receptor para el cual abundan bloqueantes (Ballestero *et al.*, 2005; Elgoyhen *et al.*, 2001; Ellison *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 1995; Lioudyno *et al.*, 2002; McIntosh *et al.*, 2005; Rothlin *et al.*, 2003) pero no agonistas ni potenciadores (Zorrilla de San Martín *et al.*, 2007). Este trabajo abre la posibilidad de diseñar nuevos análogos estructurales del ASC que podrían ser clínicamente útiles para patologías del oído interno.

## Conclusiones.

1. La activación del receptor  $\alpha 9\alpha 10$  involucra los componentes principales del sitio de unión a ACh de ambas subunidades y los componentes complementarios de  $\alpha 9$ , aunque no podemos descartar la participación de los componentes complementarios de  $\alpha 10$ .
2. A pesar de la relevancia reportada para el residuo W55 en otros nAChRs, la mutación W55T en el componente complementario de la subunidad  $\alpha 10$  no afecta marcadamente el funcionamiento del receptor  $\alpha 9\alpha 10$ .
3. El E175 de la subunidad  $\alpha 9$  y los dominios extracelulares (210 residuos N-terminales) de  $\alpha 10$  son necesarios para la potenciación por  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular del receptor  $\alpha 9\alpha 10$ .
4. El E175 de  $\alpha 10$  estaría involucrado en el bloqueo por  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular del receptor  $\alpha 9\alpha 10$ .
5. A pesar de ser extracelulares, el tramo N-terminal de TM1 y el loop TM2-TM3 no estarían involucrados en la modulación por  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular del receptor  $\alpha 9\alpha 10$ .
6. El R129 en el Cys-loop de la subunidad  $\alpha 10$  está involucrado en la modulación por  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular del receptor  $\alpha 9\alpha 10$ .
7. El receptor  $\alpha 9\alpha 10$  es potenciado por ácido ascórbico probablemente bajo un mecanismo alostérico.



## Referencias.

Akk G (2002). Contributions of the non-alpha subunit residues (loop D) to agonist binding and channel gating in the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *J Physiol* 544: 695-705.

Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 89: 73-120.

Amador M, Dani JA (1995). Mechanism for modulation of nicotinic acetylcholine receptors that can influence synaptic transmission. *J Neurosci* 15: 4525-4532.

Amato A, Connolly CN, Moss SJ, Smart TG (1999). Modulation of neuronal and recombinant GABAA receptors by redox reagents. *J Physiol* 517 ( Pt 1): 35-50.

Andersen N, Corradi J, Bartos M, Sine SM, Bouzat C (2011). Functional relationships between agonist binding sites and coupling regions of homomeric Cys-loop receptors. *J Neurosci* 31: 3662-3669.

Andersen N, Corradi J, Sine SM, Bouzat C (2013). Stoichiometry for activation of neuronal alpha7 nicotinic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 20819-20824.

Arias HR (2010). Positive and negative modulation of nicotinic receptors. *Adv Protein Chem Struct Biol* 80: 153-203.

Ashmore J (2008). Cochlear outer hair cell motility. *Physiol Rev* 88: 173-210.

Baker ER, Zwart R, Sher E, Millar NS (2004). Pharmacological properties of alpha 9 alpha 10 nicotinic acetylcholine receptors revealed by heterologous expression of subunit chimeras. *Mol Pharmacol* 65: 453-460.

Ballesterro JA, Plazas PV, Kracun S, Gomez-Casati ME, Taranda J, Rothlin CV, *et al.* (2005). Effects of quinine, quinidine, and chloroquine on alpha9alpha10 nicotinic cholinergic receptors. *Mol Pharmacol* 68: 822-829.

Ballivet M, Patrick J, Lee J, Heinemann S (1982). Molecular cloning of cDNA coding for the gamma subunit of Torpedo acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 4466-4470.

Barney R, Bohnker BK (2006). Hearing thresholds for U.S. Marines: comparison of aviation, combat arms, and other personnel. *Aviat Space Environ Med* 77: 53-56.

Bartos M, Corradi J, Bouzat C (2009). Structural basis of activation of cys-loop receptors: the extracellular-transmembrane interface as a coupling region. *Mol Neurobiol* 40: 236-252.

Beckett WS, Chamberlain D, Hallman E, May J, Hwang SA, Gomez M, *et al.* (2000). Hearing conservation for farmers: source apportionment of occupational and environmental factors contributing to hearing loss. *J Occup Environ Med* 42: 806-813.

- Benninger C, Kadis J, Prince DA (1980). Extracellular calcium and potassium changes in hippocampal slices. *Brain Res* 187: 165-182.
- Berminham-McDonogh O, Reh TA (2011). Regulated reprogramming in the regeneration of sensory receptor cells. *Neuron* 71: 389-405.
- Bertrand D, Ballivet M, Rungger D (1990). Activation and blocking of neuronal nicotinic acetylcholine receptor reconstituted in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1993-1997.
- Bertrand D, Devillers-Thiery A, Revah F, Galzi JL, Hussy N, Mulle C, *et al.* (1992). Unconventional pharmacology of a neuronal nicotinic receptor mutated in the channel domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 1261-1265.
- Bertrand D, Gopalakrishnan M (2007). Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol* 74: 1155-1163.
- Biassoni EC, Serra MR, Richtert U, Joeke S, Yacci MR, Carignani JA, *et al.* (2005). Recreational noise exposure and its effects on the hearing of adolescents. Part II: development of hearing disorders. *Int J Audiol* 44: 74-85.
- Bigelow JC, Brown DS, Wightman RM (1984). Gamma-aminobutyric acid stimulates the release of endogenous ascorbic acid from rat striatal tissue. *J Neurochem* 42: 412-419.
- Blount P, Merlie JP (1989). Molecular basis of the two nonequivalent ligand binding sites of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* 3: 349-357.
- Bocquet N, Nury H, Baaden M, Le Poupon C, Changeux JP, Delarue M, *et al.* (2009). X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation. *Nature* 457: 111-114.
- Bohnker BK, Page JC, Rovig GW, Betts LS, Sack DM (2004). Navy Hearing Conservation Program: 1995-1999 retrospective analysis of threshold shifts for age, sex, and officer/enlisted status. *Mil Med* 169: 73-76.
- Bonfante-Cabarcas R, Swanson KL, Alkondon M, Albuquerque EX (1996). Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. IV. Regulation by external  $Ca^{++}$  of alpha-bungarotoxin-sensitive receptor function and of rectification induced by internal  $Mg^{++}$ . *J Pharmacol Exp Ther* 277: 432-444.
- Boorman JP, Groot-Kormelink PJ, Sivilotti LG (2000). Stoichiometry of human recombinant neuronal nicotinic receptors containing the  $\beta 3$  subunit expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 529 Pt 3: 565-577.
- Borg E, Canlon B, Engstrom B (1995). Noise-induced hearing loss. Literature review and experiments in rabbits. Morphological and electrophysiological features, exposure parameters and temporal factors, variability and interactions. *Scand Audiol Suppl* 40: 1-147.

Bouzat C (2012). New insights into the structural bases of activation of Cys-loop receptors. *J Physiol Paris* 106: 23-33.

Bouzat C, Barrantes FJ, Sigworth FJ (1991). Changes in channel properties of acetylcholine receptors during the time course of thiol chemical modifications. *Pflugers Arch* 418: 51-61.

Bouzat C, Bartos M, Corradi J, 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.

Brejč K, van Dijk WJ, Klaassen RV, Schuurmans M, van Der Oost J, Smit AB, *et al.* (2001). Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* 411: 269-276.

Brown MC, Nuttall AL (1984). Efferent control of cochlear inner hair cell responses in the guinea-pig. *J Physiol* 354: 625-646.

Buisson B, Gopalakrishnan M, Arneric SP, Sullivan JP, Bertrand D (1996). Human alpha4beta2 neuronal nicotinic acetylcholine receptor in HEK 293 cells: A patch-clamp study. *J Neurosci* 16: 7880-7891.

Burmeister WP, Cottaz S, Rollin P, Vasella A, Henrissat B (2000). High resolution X-ray crystallography shows that ascorbate is a cofactor for myrosinase and substitutes for the function of the catalytic base. *J Biol Chem* 275: 39385-39393.

Calero CI, Calvo DJ (2008). Redox modulation of homomeric rho1 GABA receptors. *J Neurochem* 105: 2367-2374.

Calero CI, Vickers E, Moraga Cid G, Aguayo LG, von Gersdorff H, Calvo DJ (2011). Allosteric modulation of retinal GABA receptors by ascorbic acid. *J Neurosci* 31: 9672-9682.

Carbone AL, Moroni M, Groot-Kormelink PJ, Bermudez I (2009). Pentameric concatenated (alpha4)(2)(beta2)(3) and (alpha4)(3)(beta2)(2) nicotinic acetylcholine receptors: subunit arrangement determines functional expression. *Br J Pharmacol* 156: 970-981.

Celie PH, van Rossum-Fikkert SE, van Dijk WJ, Brejč K, Smit AB, Sixma TK (2004). Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures. *Neuron* 41: 907-914.

Cens T, Nargeot J, Charnet P (1997). Ca(2+)-permeability of muscle nicotinic acetylcholine receptor is increased by expression of the epsilon subunit. *Receptors Channels* 5: 29-40.

Cohen JB, Weber M, Huchet M, Changeux JP (1972). Purification from *Torpedo marmorata* electric tissue of membrane fragments particularly rich in cholinergic receptor protein. *FEBS Lett* 26: 43-47.

- Colquhoun D (1998). Binding, gating, affinity and efficacy: the interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors. *Br J Pharmacol* 125: 924-947.
- Cooper E, Couturier S, Ballivet M (1991). Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature* 350: 235-238.
- Cooper ST, Harkness PC, Baker ER, Millar NS (1999). Up-regulation of cell-surface alpha4beta2 neuronal nicotinic receptors by lower temperature and expression of chimeric subunits. *J Biol Chem* 274: 27145-27152.
- Cooper ST, Millar NS (1998). Host cell-specific folding of the neuronal nicotinic receptor alpha8 subunit. *J Neurochem* 70: 2585-2593.
- Corringer PJ, Galzi JL, Eisele JL, Bertrand S, Changeux JP, Bertrand D (1995). Identification of a new component of the agonist binding site of the nicotinic alpha 7 homooligomeric receptor. *J Biol Chem* 270: 11749-11752.
- Corringer PJ, Le Novere N, Changeux JP (2000). Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 431-458.
- Crawford AC, Evans MG, Fettiplace R (1989). Activation and adaptation of transducer currents in turtle hair cells. *J Physiol* 419: 405-434.
- Chu XP, Close N, Saugstad JA, Xiong ZG (2006). ASIC1a-specific modulation of acid-sensing ion channels in mouse cortical neurons by redox reagents. *J Neurosci* 26: 5329-5339.
- Dallos P (ed) (1996) *The Cochlea*. Springer-Verlag: New York.
- Dallos P, Harris D (1978). Properties of auditory nerve responses in absence of outer hair cells. *J Neurophysiol* 41: 365-383.
- Dani JA (2001). Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biol Psychiatry* 49: 166-174.
- Decker ER, Dani JA (1990). Calcium permeability of the nicotinic acetylcholine receptor: the single-channel calcium influx is significant. *J Neurosci* 10: 3413-3420.
- Delano PH, Elgueda D, Hamame CM, Robles L (2007). Selective attention to visual stimuli reduces cochlear sensitivity in chinchillas. *J Neurosci* 27: 4146-4153.
- Dellisanti CD, Yao Y, Stroud JC, Wang ZZ, Chen L (2007). Crystal structure of the extracellular domain of nAChR alpha1 bound to alpha-bungarotoxin at 1.94 Å resolution. *Nat Neurosci* 10: 953-962.
- Dunckley T, Wu J, Zhao L, Lukas RJ (2003). Mutational analysis of roles for extracellular cysteine residues in the assembly and function of human alpha 7-nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemistry* 42: 870-876.

- Dyer DL, Kanai Y, Hediger MA, Rubin SA, Said HM (1994). Expression of a rabbit renal ascorbic acid transporter in *Xenopus laevis* oocytes. *Am J Physiol* 267: C301-306.
- Ebihara L (1996). *Xenopus* connexin38 forms hemi-gap-junctional channels in the nonjunctional plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *Biophys J* 71: 742-748.
- Eddins D, Lyford LK, Lee JW, Desai SA, Rosenberg RL (2002a). Permeant but not impermeant divalent cations enhance activation of nondesensitizing alpha(7) nicotinic receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C796-804.
- Eddins D, Sproul AD, Lyford LK, McLaughlin JT, Rosenberg RL (2002b). Glutamate 172, essential for modulation of L247T alpha7 ACh receptors by Ca<sup>2+</sup>, lines the extracellular vestibule. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C1454-1460.
- Eisele JL, Bertrand S, Galzi JL, Devillers-Thiery A, Changeux JP, Bertrand D (1993). Chimaeric nicotinic-serotonergic receptor combines distinct ligand binding and channel specificities. *Nature* 366: 479-483.
- Elgoyhen AB, Johnson DS, Boulter J, Vetter DE, Heinemann S (1994). Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* 79: 705-715.
- Elgoyhen AB, Katz E (2012). The efferent medial olivocochlear-hair cell synapse. *J Physiol Paris*.
- Elgoyhen AB, Katz E, Fuchs PA (2009). The nicotinic receptor of cochlear hair cells: a possible pharmacotherapeutic target? *Biochem Pharmacol* 78: 712-719.
- Elgoyhen AB, Vetter DE, Katz E, Rothlin CV, Heinemann SF, Boulter J (2001). alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3501-3506.
- Ellison M, Haberlandt C, Gomez-Casati ME, Watkins M, Elgoyhen AB, McIntosh JM, et al. (2006). Alpha-RgIA: a novel conotoxin that specifically and potently blocks the alpha9alpha10 nAChR. *Biochemistry* 45: 1511-1517.
- Evans RM, Currie L, Campbell A (1982). The distribution of ascorbic acid between various cellular components of blood, in normal individuals, and its relation to the plasma concentration. *Br J Nutr* 47: 473-482.
- Ewins AJ (1914). Acetylcholine, a New Active Principle of Ergot. *Biochem J* 8: 44-49.
- Fettiplace R (2009). Defining features of the hair cell mechano-electrical transducer channel. *Pflugers Arch* 458: 1115-1123.
- Filatov GN, White MM (1995). The role of conserved leucines in the M2 domain of the acetylcholine receptor in channel gating. *Mol Pharmacol* 48: 379-384.

- Fuchs PA, Glowatzki E, Moser T (2003). The afferent synapse of cochlear hair cells. *Curr Opin Neurobiol* 13: 452-458.
- Galambos R (1956). Suppression of auditory nerve activity by stimulation of efferent fibers to cochlea. *J Neurophysiol* 19: 424-437.
- Galzi JL, Bertrand S, Corringer PJ, Changeux JP, Bertrand D (1996). Identification of calcium binding sites that regulate potentiation of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *EMBO J* 15: 5824-5832.
- Gao F, Mer G, Tonelli M, Hansen SB, Burghardt TP, Taylor P, *et al.* (2006). Solution NMR of acetylcholine binding protein reveals agonist-mediated conformational change of the C-loop. *Mol Pharmacol* 70: 1230-1235.
- Gay EA, Giniatullin R, Skorinkin A, Yakel JL (2008). Aromatic residues at position 55 of rat alpha7 nicotinic acetylcholine receptors are critical for maintaining rapid desensitization. *J Physiol* 586: 1105-1115.
- Gay EA, Yakel JL (2007). Gating of nicotinic ACh receptors; new insights into structural transitions triggered by agonist binding that induce channel opening. *J Physiol* 584: 727-733.
- Gerzanich V, Anand R, Lindstrom J (1994). Homomers of alpha 8 and alpha 7 subunits of nicotinic receptors exhibit similar channel but contrasting binding site properties. *Mol Pharmacol* 45: 212-220.
- Gifford ML, Guinan JJ, Jr. (1987). Effects of electrical stimulation of medial olivocochlear neurons on ipsilateral and contralateral cochlear responses. *Hear Res* 29: 179-194.
- Gill JK, Savolainen M, Young GT, Zwart R, Sher E, 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.
- Gleitsman KR, Kedrowski SM, Lester HA, Dougherty DA (2008). An intersubunit hydrogen bond in the nicotinic acetylcholine receptor that contributes to channel gating. *J Biol Chem* 283: 35638-35643.
- Gomez-Casati ME, Katz E, Glowatzki E, Lioudyno MI, Fuchs P, Elgoyhen AB (2004). Linopirdine blocks alpha9alpha10-containing nicotinic cholinergic receptors of cochlear hair cells. *J Assoc Res Otolaryngol* 5: 261-269.
- Grassi F, Degasperis V (2000). Modulation of fetal and adult acetylcholine receptors by Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> at developing mouse end-plates. *Pflugers Arch* 440: 704-709.
- Grunewald RA (1993). Ascorbic acid in the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 18: 123-133.

Guinan JJ, Jr., Warr WB, Norris BE (1983). Differential olivocochlear projections from lateral versus medial zones of the superior olivary complex. *J Comp Neurol* 221: 358-370.

Hansen SB, Sulzenbacher G, Huxford T, Marchot P, Taylor P, Bourne Y (2005). Structures of Aplysia AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations. *EMBO J* 24: 3635-3646.

Harkness PC, Millar NS (2002). Changes in conformation and subcellular distribution of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors revealed by chronic nicotine treatment and expression of subunit chimeras. *J Neurosci* 22: 10172-10181.

Harrison FE, May JM (2009). Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radic Biol Med* 46: 719-730.

Hartman A, Heilbronn E (1978). Synaptic membranes from *Torpedo marmorata* electric organ. 1. Separation and analysis of nicotinic acetylcholine receptor- and acetylcholinesterase-containing membrane vesicles using aqueous two-phase systems. *Biochim Biophys Acta* 513: 382-394.

Hediger MA (2002). New view at C. *Nat Med* 8: 445-446.

Heinrich UR, Fischer I, Brieger J, Rumelin A, Schmidtman I, Li H, *et al.* (2008). Ascorbic acid reduces noise-induced nitric oxide production in the guinea pig ear. *Laryngoscope* 118: 837-842.

Henderson D, Bielefeld EC, Harris KC, Hu BH (2006). The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. *Ear Hear* 27: 1-19.

Henderson D, Hamernik RP (1995). Biologic bases of noise-induced hearing loss. *Occup Med* 10: 513-534.

Hilf RJ, Dutzler R (2009). Structure of a potentially open state of a proton-activated pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* 457: 115-118.

Hilf RJ, Dutzler R (2008). X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* 452: 375-379.

Hong O, Kerr MJ, Poling GL, Dhar S (2013). Understanding and preventing noise-induced hearing loss. *Dis Mon* 59: 110-118.

Hong OS, Kim MJ (2001). Factors associated with hearing loss among workers of the airline industry in Korea. *ORL Head Neck Nurs* 19: 7-13.

Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996). VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14: 33-38, 27-38.

Ifune CK, Steinbach JH (1991). Voltage-dependent block by magnesium of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channels in rat pheochromocytoma cells. *J Physiol* 443: 683-701.

Imoto K, Busch C, Sakmann B, Mishina M, Konno T, Nakai J, *et al.* (1988). Rings of negatively charged amino acids determine the acetylcholine receptor channel conductance. *Nature* 335: 645-648.

Jaruchinda P, Thongdeetae T, Panichkul S, Hanchumpol P (2005). Prevalence and an analysis of noise--induced hearing loss in army helicopter pilots and aircraft mechanics. *J Med Assoc Thai* 88 Suppl 3: S232-239.

Johnson DS, Martinez J, Elgoyhen AB, Heinemann SF, McIntosh JM (1995). alpha-Conotoxin ImI exhibits subtype-specific nicotinic acetylcholine receptor blockade: preferential inhibition of homomeric alpha 7 and alpha 9 receptors. *Mol Pharmacol* 48: 194-199.

Jones AK, Elgar G, Sattelle DB (2003). The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the pufferfish, *Fugu rubripes*. *Genomics* 82: 441-451.

Kalamida D, Poulas K, Avramopoulou V, Fostieri E, Lagoumintzis G, Lazaridis K, *et al.* (2007). Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity. *FEBS J* 274: 3799-3845.

Kao PN, Karlin A (1986). Acetylcholine receptor binding site contains a disulfide cross-link between adjacent half-cystinyl residues. *J Biol Chem* 261: 8085-8088.

Karlin A (2002). Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci* 3: 102-114.

Kashio A, Amano A, Kondo Y, Sakamoto T, Iwamura H, Suzuki M, *et al.* (2009). Effect of vitamin C depletion on age-related hearing loss in SMP30/GNL knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 390: 394-398.

Katz B, Thesleff S (1957). A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J Physiol* 138: 63-80.

Katz E, Elgoyhen AB, Gomez-Casati ME, Knipper M, Vetter DE, Fuchs PA, *et al.* (2004). Developmental regulation of nicotinic synapses on cochlear inner hair cells. *J Neurosci* 24: 7814-7820.

Katz E, Verbitsky M, Rothlin CV, Vetter DE, Heinemann SF, Elgoyhen AB (2000). High calcium permeability and calcium block of the alpha9 nicotinic acetylcholine receptor. *Hear Res* 141: 117-128.

Kawase T, Delgutte B, Liberman MC (1993). Antimasking effects of the olivocochlear reflex. II. Enhancement of auditory-nerve response to masked tones. *J Neurophysiol* 70: 2533-2549.

Kim J, Park H, Ha E, Jung T, Paik N, Yang S (2005). Combined effects of noise and mixed solvents exposure on the hearing function among workers in the aviation industry. *Ind Health* 43: 567-573.



- Klomsiri C, Karplus PA, Poole LB (2011). Cysteine-based redox switches in enzymes. *Antioxid Redox Signal* 14: 1065-1077.
- Kujawa SG, Glatcke TJ, Fallon M, Bobbin RP (1994). A nicotinic-like receptor mediates suppression of distortion product otoacoustic emissions by contralateral sound. *Hear Res* 74: 122-134.
- Kujawa SG, Liberman MC (2009). Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after "temporary" noise-induced hearing loss. *J Neurosci* 29: 14077-14085.
- Kumar A, Mathur NN, Varghese M, Mohan D, Singh JK, Mahajan P (2005). Effect of tractor driving on hearing loss in farmers in India. *Am J Ind Med* 47: 341-348.
- Labarca C, Nowak MW, Zhang H, Tang L, Deshpande P, Lester HA (1995). Channel gating governed symmetrically by conserved leucine residues in the M2 domain of nicotinic receptors. *Nature* 376: 514-516.
- Landen D, Wilkins S, Stephenson M, McWilliams L (2004). Noise exposure and hearing loss among sand and gravel miners. *J Occup Environ Hyg* 1: 532-541.
- Landino LM, Koumas MT, Mason CE, Alston JA (2006). Ascorbic acid reduction of microtubule protein disulfides and its relevance to protein S-nitrosylation assays. *Biochem Biophys Res Commun* 340: 347-352.
- Landon P, Breysse P, Chen Y (2005). Noise exposures of rail workers at a North American chemical facility. *Am J Ind Med* 47: 364-369.
- Langley JN (1907). On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of "receptive" substances: Part I. *J Physiol* 36: 347-384.
- Lansdell SJ, Millar NS (2000). The influence of nicotinic receptor subunit composition upon agonist, alpha-bungarotoxin and insecticide (imidacloprid) binding affinity. *Neuropharmacology* 39: 671-679.
- Le Novere N, Grutter T, Changeux JP (2002). Models of the extracellular domain of the nicotinic receptors and of agonist- and Ca<sup>2+</sup>-binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 3210-3215.
- Le Prell CG, Hughes LF, Miller JM (2007). Free radical scavengers vitamins A, C, and E plus magnesium reduce noise trauma. *Free Radic Biol Med* 42: 1454-1463.
- Lena C, Changeux JP (1993). Allosteric modulations of the nicotinic acetylcholine receptor. *Trends Neurosci* 16: 181-186.
- Leprince P (1983). Chemical modification of the nicotinic cholinergic receptor of PC-12 nerve cell. *Biochemistry* 22: 5551-5556.
- Lester HA, Dibas MI, Dahan DS, Leite JF, Dougherty DA (2004). Cys-loop receptors: new twists and turns. *Trends Neurosci* 27: 329-336.

- Lieberman MC (1980). Efferent synapses in the inner hair cell area of the cat cochlea: an electron microscopic study of serial sections. *Hear Res* 3: 189-204.
- Lieberman MC (1991). The olivocochlear efferent bundle and susceptibility of the inner ear to acoustic injury. *J Neurophysiol* 65: 123-132.
- Lieberman MC, Gao J, He DZ, Wu X, Jia S, Zuo J (2002). Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. *Nature* 419: 300-304.
- Lim DJ (1986). Effects of noise and ototoxic drugs at the cellular level in the cochlea: a review. *Am J Otolaryngol* 7: 73-99.
- Lioudyno M, Hiel H, Kong JH, Katz E, Waldman E, Parameshwaran-Iyer S, *et al.* (2004). A "synaptoplasmic cistern" mediates rapid inhibition of cochlear hair cells. *J Neurosci* 24: 11160-11164.
- Lioudyno MI, Verbitsky M, Glowatzki E, Holt JC, Boulter J, Zadina JE, *et al.* (2002). The alpha9/alpha10-containing nicotinic ACh receptor is directly modulated by opioid peptides, endomorphin-1, and dynorphin B, proposed efferent cotransmitters in the inner ear. *Mol Cell Neurosci* 20: 695-711.
- Lipovsek M, Im GJ, Franchini LF, Pisciotto F, Katz E, Fuchs PA, *et al.* (2012). Phylogenetic differences in calcium permeability of the auditory hair cell cholinergic nicotinic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 4308-4313.
- Lipovsek MM Consecuencias Funcionales de la Evolución Adaptativa del Receptor Nicotínico  $\alpha 9\alpha 10$ . Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, 2011.
- Lips KS, Pfeil U, Kummer W (2002). Coexpression of alpha 9 and alpha 10 nicotinic acetylcholine receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 115: 1-5.
- Liu QS, Berg DK (1999). Extracellular calcium regulates responses of both alpha3- and alpha7-containing nicotinic receptors on chick ciliary ganglion neurons. *J Neurophysiol* 82: 1124-1132.
- Livsey CT, Huang B, Xu J, Karwoski CJ (1990). Light-evoked changes in extracellular calcium concentration in frog retina. *Vision Res* 30: 853-861.
- Lucas-Meunier E, Fossier P, Baux G, Amar M (2003). Cholinergic modulation of the cortical neuronal network. *Pflugers Arch* 446: 17-29.
- Luo S, Christensen S, Zhangsun D, Wu Y, Hu Y, Zhu X, *et al.* (2013). A novel inhibitor of alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptors from *Conus vexillum* delineates a new conotoxin superfamily. *PLoS One* 8: e54648.
- Lyford LK, Sproul AD, Eddins D, McLaughlin JT, Rosenberg RL (2003). Agonist-induced conformational changes in the extracellular domain of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 64: 650-658.

Lynch ED, Kil J (2005). Compounds for the prevention and treatment of noise-induced hearing loss. *Drug Discov Today* 10: 1291-1298.

Maison SF, Luebke AE, Liberman MC, Zuo J (2002). Efferent protection from acoustic injury is mediated via alpha9 nicotinic acetylcholine receptors on outer hair cells. *J Neurosci* 22: 10838-10846.

Majewska MD, Bell JA, London ED (1990). Regulation of the NMDA receptor by redox phenomena: inhibitory role of ascorbate. *Brain Res* 537: 328-332.

Martinez KL, Corringer PJ, Edelstein SJ, Changeux JP, Merola F (2000). Structural differences in the two agonist binding sites of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor revealed by time-resolved fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* 39: 6979-6990.

Marx JL (1983). Cloning the acetylcholine receptor genes. *Science* 219: 1055-1056.

Mazzaferro S, Benallegue N, Carbone A, Gasparri F, Vijayan R, Biggin PC, *et al.* (2011). Additional acetylcholine (ACh) binding site at alpha4/alpha4 interface of (alpha4beta2)2alpha4 nicotinic receptor influences agonist sensitivity. *J Biol Chem* 286: 31043-31054.

McFadden SL, Woo JM, Michalak N, Ding D (2005). Dietary vitamin C supplementation reduces noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Hear Res* 202: 200-208.

McIntosh JM, Plazas PV, Watkins M, Gomez-Casati ME, Olivera BM, Elgoyhen AB (2005). A novel alpha-conotoxin, PeIA, cloned from *Conus pergrandis*, discriminates between rat alpha9alpha10 and alpha7 nicotinic cholinergic receptors. *J Biol Chem* 280: 30107-30112.

McLaughlin JT, Barron SC, See JA, Rosenberg RL (2009). Conformational changes in alpha 7 acetylcholine receptors underlying allosteric modulation by divalent cations. *BMC Pharmacol* 9: 1.

McLaughlin JT, Fu J, Sproul AD, Rosenberg RL (2006). Role of the outer beta-sheet in divalent cation modulation of alpha7 nicotinic receptors. *Mol Pharmacol* 70: 16-22.

Miele M, Fillenz M (1996). In vivo determination of extracellular brain ascorbate. *J Neurosci Methods* 70: 15-19.

Millar NS, Gotti C (2009). Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 56: 237-246.

Miller C (1989). Genetic manipulation of ion channels: a new approach to structure and mechanism. *Neuron* 2: 1195-1205.

Mishra P, Prem Kumar R, Ethayathulla AS, Singh N, Sharma S, Perbandt M, *et al.* (2009). Polysaccharide binding sites in hyaluronate lyase--crystal structures of native

phage-encoded hyaluronate lyase and its complexes with ascorbic acid and lactose. *FEBS J* 276: 3392-3402.

Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Stowell M, Unwin N (1999). Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall. *J Mol Biol* 288: 765-786.

Monod J, Wyman J, Changeux JP (1965). On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J Mol Biol* 12: 88-118.

Mountain DC, Geisler CD, Hubbard AE (1980). Stimulation of efferents alters the cochlear microphonic and the sound-induced resistance changes measured in scale media of the guinea pig. *Hear Res* 3: 231-240.

Mukhtasimova N, Free C, Sine SM (2005). Initial coupling of binding to gating mediated by conserved residues in the muscle nicotinic receptor. *J Gen Physiol* 126: 23-39.

Mulroy MJ, Henry WR, McNeil PL (1998). Noise-induced transient microlesions in the cell membranes of auditory hair cells. *Hear Res* 115: 93-100.

Mulle C, Choquet D, Korn H, Changeux JP (1992a). Calcium influx through nicotinic receptor in rat central neurons: its relevance to cellular regulation. *Neuron* 8: 135-143.

Mulle C, Lena C, Changeux JP (1992b). Potentiation of nicotinic receptor response by external calcium in rat central neurons. *Neuron* 8: 937-945.

Murugasu E, Russell IJ (1996). The effect of efferent stimulation on basilar membrane displacement in the basal turn of the guinea pig cochlea. *J Neurosci* 16: 325-332.

Neher E, Sakmann B (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799-802.

Neitzel R, Meischke H, Daniell WE, Trabeau M, Somers S, Seixas NS (2008). Development and pilot test of hearing conservation training for construction workers. *Am J Ind Med* 51: 120-129.

Neitzel R, Yost M (2002). Task-based assessment of occupational vibration and noise exposures in forestry workers. *AIHA J (Fairfax, Va)* 63: 617-627.

Nelson MT, Joksovic PM, Su P, Kang HW, Van Deusen A, Baumgart JP, *et al.* (2007). Molecular mechanisms of subtype-specific inhibition of neuronal T-type calcium channels by ascorbate. *J Neurosci* 27: 12577-12583.

Noda M, Takahashi H, Tanabe T, Toyosato M, Furutani Y, Hirose T, *et al.* (1982). Primary structure of alpha-subunit precursor of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence. *Nature* 299: 793-797.

- Noda M, Takahashi H, Tanabe T, Toyosato M, Kikuyotani S, Furutani Y, *et al.* (1983a). Structural homology of *Torpedo californica* acetylcholine receptor subunits. *Nature* 302: 528-532.
- Noda M, Takahashi H, Tanabe T, Toyosato M, Kikuyotani S, Hirose T, *et al.* (1983b). Primary structures of beta- and delta-subunit precursors of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequences. *Nature* 301: 251-255.
- Ohinata Y, Miller JM, Altschuler RA, Schacht J (2000). Intense noise induces formation of vasoactive lipid peroxidation products in the cochlea. *Brain Res* 878: 163-173.
- Ohlemiller KK (2008). Recent findings and emerging questions in cochlear noise injury. *Hear Res* 245: 5-17.
- Ohlemiller KK, Wright JS, Dugan LL (1999). Early elevation of cochlear reactive oxygen species following noise exposure. *Audiol Neurootol* 4: 229-236.
- Pan J, Chen Q, Willenbring D, Yoshida K, Tillman T, Kashlan OB, *et al.* (2012). Structure of the pentameric ligand-gated ion channel ELIC cocrystallized with its competitive antagonist acetylcholine. *Nat Commun* 3: 714.
- Pan ZH, Zhang X, Lipton SA (2000). Redox modulation of recombinant human GABA(A) receptors. *Neuroscience* 98: 333-338.
- Pande J, Myer JP (1980). The arginines of cytochrome c. The reduction-binding site for 2,3-butanedione and ascorbate. *J Biol Chem* 255: 11094-11097.
- Patrick J, Ballivet M, Boas L, Claudio T, Forrest J, Ingraham H, *et al.* (1983). Molecular cloning of the acetylcholine receptor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 48 Pt 1: 71-78.
- Patuzzi R (2002). Non-linear aspects of outer hair cell transduction and the temporary threshold shifts after acoustic trauma. *Audiol Neurootol* 7: 17-20.
- Plazas PV, De Rosa MJ, Gomez-Casati ME, Verbitsky M, Weisstaub N, Katz E, *et al.* (2005a). Key roles of hydrophobic rings of TM2 in gating of the alpha9alpha10 nicotinic cholinergic receptor. *Br J Pharmacol* 145: 963-974.
- Plazas PV, Katz E, Gomez-Casati ME, Bouzat C, Elgoyhen AB (2005b). Stoichiometry of the alpha9alpha10 nicotinic cholinergic receptor. *J Neurosci* 25: 10905-10912.
- Plazas PV, Savino J, Kracun S, Gomez-Casati ME, Katz E, Parsons CG, *et al.* (2007). Inhibition of the alpha9alpha10 nicotinic cholinergic receptor by neramexane, an open channel blocker of N-methyl-D-aspartate receptors. *Eur J Pharmacol* 566: 11-19.
- Portugal CC, Miya VS, Calaza Kda C, Santos RA, Paes-de-Carvalho R (2009). Glutamate receptors modulate sodium-dependent and calcium-independent vitamin C bidirectional transport in cultured avian retinal cells. *J Neurochem* 108: 507-520.

- Prince RJ, Sine SM (1999). Acetylcholine and epibatidine binding to muscle acetylcholine receptors distinguish between concerted and uncoupled models. *J Biol Chem* 274: 19623-19629.
- Pujol R, Puel JL, Gervais d'Aldin C, Eybalin M (1993). Pathophysiology of the glutamatergic synapses in the cochlea. *Acta Otolaryngol* 113: 330-334.
- Pumain R, Heinemann U (1985). Stimulus- and amino acid-induced calcium and potassium changes in rat neocortex. *J Neurophysiol* 53: 1-16.
- Pumain R, Kurcewicz I, Louvel J (1987). Ionic changes induced by excitatory amino acids in the rat cerebral cortex. *Can J Physiol Pharmacol* 65: 1067-1077.
- Quick MW, Lester RA (2002). Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J Neurobiol* 53: 457-478.
- Ragozzino D, Barabino B, Fucile S, Eusebi F (1998). Ca<sup>2+</sup> permeability of mouse and chick nicotinic acetylcholine receptors expressed in transiently transfected human cells. *J Physiol* 507 ( Pt 3): 749-757.
- Rajan R (2000). Centrifugal pathways protect hearing sensitivity at the cochlea in noisy environments that exacerbate the damage induced by loud sound. *J Neurosci* 20: 6684-6693.
- Ramirez-Latorre J, Yu CR, Qu X, Perin F, Karlin A, Role L (1996). Functional contributions of alpha5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels. *Nature* 380: 347-351.
- Rayes D, De Rosa MJ, Sine SM, Bouzat C (2009). Number and locations of agonist binding sites required to activate homomeric Cys-loop receptors. *J Neurosci* 29: 6022-6032.
- Rebec GV, Pierce RC (1994). A vitamin as neuromodulator: ascorbate release into the extracellular fluid of the brain regulates dopaminergic and glutamatergic transmission. *Prog Neurobiol* 43: 537-565.
- Reiber H, Ruff M, Uhr M (1993). Ascorbate concentration in human cerebrospinal fluid (CSF) and serum. Intrathecal accumulation and CSF flow rate. *Clin Chim Acta* 217: 163-173.
- Revah F, Bertrand D, Galzi JL, Devillers-Thierry A, Mulle C, Hussy N, *et al.* (1991). Mutations in the channel domain alter desensitization of a neuronal nicotinic receptor. *Nature* 353: 846-849.
- Rice ME, Russo-Menna I (1998). Differential compartmentalization of brain ascorbate and glutathione between neurons and glia. *Neuroscience* 82: 1213-1223.
- Roberts LE, Eggermont JJ, Caspary DM, Shore SE, Melcher JR, Kaltenbach JA (2010). Ringing ears: the neuroscience of tinnitus. *J Neurosci* 30: 14972-14979.

Robertson D (1983). Functional significance of dendritic swelling after loud sounds in the guinea pig cochlea. *Hear Res* 9: 263-278.

Robles L, Ruggero MA (2001). Mechanics of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* 81: 1305-1352.

Robles L, Ruggero MA, Rich NC (1986). Basilar membrane mechanics at the base of the chinchilla cochlea. I. Input-output functions, tuning curves, and response phases. *J Acoust Soc Am* 80: 1364-1374.

Rodrigues-Pinguet N, Jia L, Li M, Figl A, Klaassen A, Truong A, *et al.* (2003). Five ADNFLE mutations reduce the Ca<sup>2+</sup> dependence of the mammalian alpha4beta2 acetylcholine response. *J Physiol* 550: 11-26.

Rose RC, Bode AM (1991). Ocular ascorbate transport and metabolism. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 100: 273-285.

Rothlin CV, Lioudyno MI, Silbering AF, Plazas PV, Casati ME, Katz E, *et al.* (2003). Direct interaction of serotonin type 3 receptor ligands with recombinant and native alpha 9 alpha 10-containing nicotinic cholinergic receptors. *Mol Pharmacol* 63: 1067-1074.

Rovig GW, Bohnker BK, Page JC (2004). Hearing health risk in a population of aircraft carrier flight deck personnel. *Mil Med* 169: 429-432.

Ruiz-Gomez A, Fernandez-Shaw C, Morato E, Marvizon JC, Vazquez J, Valdivieso F, *et al.* (1991). Sulfhydryl groups modulate the allosteric interaction between glycine binding sites at the inhibitory glycine receptor. *J Neurochem* 56: 1690-1697.

Ruppersberg JP, Stocker M, Pongs O, Heinemann SH, Frank R, Koenen M (1991). Regulation of fast inactivation of cloned mammalian IK(A) channels by cysteine oxidation. *Nature* 352: 711-714.

Sali A, Blundell TL (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 234: 779-815.

Salt AN, Thalmann R (1988) Cochlear fluid dynamics. In: *Physiology of the Ear.*, Jahn AF, S-SJ (ed), pp 341-357. New York: Raven press.

Sands SB, Barish ME (1992). Neuronal nicotinic acetylcholine receptor currents in pheochromocytoma (PC12) cells: dual mechanisms of rectification. *J Physiol* 447: 467-487.

Schoepfer R, Whiting P, Esch F, Blacher R, Shimasaki S, Lindstrom J (1988). cDNA clones coding for the structural subunit of a chicken brain nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* 1: 241-248.

Seguela P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, 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.

- Serra MR, Biassoni EC, Richter U, Minoldo G, Franco G, Abraham S, *et al.* (2005). Recreational noise exposure and its effects on the hearing of adolescents. Part I: an interdisciplinary long-term study. *Int J Audiol* 44: 65-73.
- Seshagiri B (2003). Exposure to noise on board locomotives. *AIHA J (Fairfax, Va)* 64: 699-707.
- Sgard F, Charpantier E, Bertrand S, Walker N, Caput D, Graham D, *et al.* (2002). A novel human nicotinic receptor subunit, alpha10, that confers functionality to the alpha9-subunit. *Mol Pharmacol* 61: 150-159.
- Sharp KH, Mewies M, Moody PC, Raven EL (2003). Crystal structure of the ascorbate peroxidase-ascorbate complex. *Nat Struct Biol* 10: 303-307.
- Siegel JH, Kim DO (1982). Efferent neural control of cochlear mechanics? Olivocochlear bundle stimulation affects cochlear biomechanical nonlinearity. *Hear Res* 6: 171-182.
- Sine SM, Quiram P, Papanikolaou F, Kreienkamp HJ, Taylor P (1994). Conserved tyrosines in the alpha subunit of the nicotinic acetylcholine receptor stabilize quaternary ammonium groups of agonists and curariform antagonists. *J Biol Chem* 269: 8808-8816.
- Smit AB, Syed NI, Schaap D, van Minnen J, Klumperman J, Kits KS, *et al.* (2001). A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature* 411: 261-268.
- Sobel A, Changeux JP (1977). Purification and characterization of the cholinergic receptor protein in its membrane-bound and detergent-soluble forms from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *Biochem Soc Trans* 5: 511-514.
- Sobel A, Weber M, Changeux JP (1977). Large-scale purification of the acetylcholine-receptor protein in its membrane-bound and detergent-extracted forms from *Torpedo marmorata* electric organ. *Eur J Biochem* 80: 215-224.
- Solecki L (2006). Characteristics of annual exposure to noise among private farmers on family farms of mixed-production profile. *Ann Agric Environ Med* 13: 113-118.
- Spector R (2009). Nutrient transport systems in brain: 40 years of progress. *J Neurochem* 111: 315-320.
- Spoendlin H (1971). Primary structural changes in the organ of Corti after acoustic overstimulation. *Acta Otolaryngol* 71: 166-176.
- Spurny R, Ramerstorfer J, Price K, Brams M, Ernst M, Nury H, *et al.* (2012). Pentameric ligand-gated ion channel ELIC is activated by GABA and modulated by benzodiazepines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: E3028-3034.



- Stitzel JA, Campbell SM, Collins AC, Marks MJ (1988). Sulfhydryl modification of two nicotinic binding sites in mouse brain. *J Neurochem* 50: 920-928.
- Sullivan JM, Traynelis SF, Chen HS, Escobar W, Heinemann SF, Lipton SA (1994). Identification of two cysteine residues that are required for redox modulation of the NMDA subtype of glutamate receptor. *Neuron* 13: 929-936.
- Szewczyk E, Nayak T, Oakley CE, Edgerton H, Xiong Y, Taheri-Talesh N, *et al.* (2006). Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat Protoc* 1: 3111-3120.
- Tansey EM (1991). Chemical neurotransmission in the autonomic nervous system: Sir Henry Dale and acetylcholine. *Clin Auton Res* 1: 63-72.
- Tansey EM (2006). Henry Dale and the discovery of acetylcholine. *C R Biol* 329: 419-425.
- Taranda J, Maison SF, Ballesterro JA, Katz E, Savino J, Vetter DE, *et al.* (2009). A point mutation in the hair cell nicotinic cholinergic receptor prolongs cochlear inhibition and enhances noise protection. *PLoS Biol* 7: e18.
- Tierney ML, Unwin N (2000). Electron microscopic evidence for the assembly of soluble pentameric extracellular domains of the nicotinic acetylcholine receptor. *J Mol Biol* 303: 185-196.
- Trabeau M, Neitzel R, Meischke H, Daniell WE, Seixas NS (2008). A comparison of "Train-the-Trainer" and expert training modalities for hearing protection use in construction. *Am J Ind Med* 51: 130-137.
- Unwin N (1993). Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *J Mol Biol* 229: 1101-1124.
- Unwin N (2005). Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J Mol Biol* 346: 967-989.
- Unwin N (2003). Structure and action of the nicotinic acetylcholine receptor explored by electron microscopy. *FEBS Lett* 555: 91-95.
- Verbitsky M, Plazas PV, Elgoyhen AB (2003). Functional expression and properties of a nicotinic alpha9/5-HT3A chimeric receptor. *Neuroreport* 14: 1931-1934.
- Vernino S, Amador M, Luetje CW, Patrick J, Dani JA (1992). Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron* 8: 127-134.
- Vetter DE, Katz E, Maison SF, Taranda J, Turcan S, Ballesterro J, *et al.* (2007). The alpha10 nicotinic acetylcholine receptor subunit is required for normal synaptic function and integrity of the olivocochlear system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 20594-20599.

- Vinclair M, Wittenauer S, Parker R, Ellison M, Olivera BM, McIntosh JM (2006). Molecular mechanism for analgesia involving specific antagonism of alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 17880-17884.
- Vio MM, Holme RH (2005). Hearing loss and tinnitus: 250 million people and a US\$10 billion potential market. *Drug Discov Today* 10: 1263-1265.
- Vollrath MA, Kwan KY, Corey DP (2007). The micromachinery of mechanotransduction in hair cells. *Annu Rev Neurosci* 30: 339-365.
- Von Bekesy G (1956). Current status of theories of hearing. *Science* 123: 779-783.
- Weisstaub N, Vetter DE, Elgoyhen AB, Katz E (2002). The alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptor is permeable to and is modulated by divalent cations. *Hear Res* 167: 122-135.
- Woodhull AM (1973). Ionic blockage of sodium channels in nerve. *J Gen Physiol* 61: 687-708.
- Wu X, Gao J, Guo Y, Zuo J (2004). Hearing threshold elevation precedes hair-cell loss in prestin knockout mice. *Brain Res Mol Brain Res* 126: 30-37.
- Xie Y, Cohen JB (2001). Contributions of Torpedo nicotinic acetylcholine receptor gamma Trp-55 and delta Trp-57 to agonist and competitive antagonist function. *J Biol Chem* 276: 2417-2426.
- Yamane H, Nakai Y, Takayama M, Iguchi H, Nakagawa T, Kojima A (1995). Appearance of free radicals in the guinea pig inner ear after noise-induced acoustic trauma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 252: 504-508.
- Yang S, Weiner BD, Zhang LS, Cho SJ, Bao S (2011). Homeostatic plasticity drives tinnitus perception in an animal model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 14974-14979.
- Yu R, Kompella SN, Adams DJ, Craik DJ, Kaas Q (2013). Determination of the alpha-conotoxin Vc1.1 binding site on the alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptor. *J Med Chem* 56: 3557-3567.
- Zhong W, Gallivan JP, Zhang Y, Li L, Lester HA, Dougherty DA (1998). From ab initio quantum mechanics to molecular neurobiology: a cation-pi binding site in the nicotinic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 12088-12093.
- Zorrilla de San Martin J, Ballesterro J, Katz E, Elgoyhen AB, Fuchs PA (2007). Ryanodine is a positive modulator of acetylcholine receptor gating in cochlear hair cells. *J Assoc Res Otolaryngol* 8: 474-483.
- Zorrilla de San Martin J, Pyott S, Ballesterro J, Katz E (2010). Ca(2+) and Ca(2+)-activated K(+) channels that support and modulate transmitter release at the olivocochlear efferent-inner hair cell synapse. *J Neurosci* 30: 12157-12167.

Zouridakis M, Zisimopoulou P, Poulas K, Tzartos SJ (2009). Recent advances in understanding the structure of nicotinic acetylcholine receptors. *IUBMB Life* 61: 407-423.