



**Departamento de Farmacología y Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid**

**El receptor nicotínico α_7 y la
inflamación: modulación endógena por
 $\text{dup}\alpha_7$ y vías de señalización involucradas**

TESIS DOCTORAL

María Constanza Maldifassi Gatica

Madrid, 2014



**Departamento de Farmacología y Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid**

Dra. CARMEN MONTIEL LÓPEZ, Catedrática del Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICA, que María Constanza Maldifassi Gatica ha realizado, bajo su dirección, el presente trabajo titulado: **“El receptor nicotínico α_7 y la inflamación: modulación endógena por $\text{dup}\alpha_7$ y vías de señalización involucradas”**, como Tesis para alcanzar el grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente certificado en Madrid a 10 de Enero 2014.

Fdo. Profa. Carmen Montiel López

A Elio y René

Agradecimientos

Quisiera expresar mis profundos agradecimientos hacia aquellas personas que han hecho posible la realización de este trabajo mediante su apoyo y compañía, especialmente a:

A Carmen Montiel, por haberme recibido en su laboratorio y haberme dado la posibilidad de realizar esta tesis doctoral. Por haberme formado como investigadora, y por su ayuda en la búsqueda de soluciones a problemas que surgieron durante el transcurso de esta tesis.

A Jaime Renart, por su ayuda y disponibilidad para aclarar dudas y resultados obtenidos.

A Cecilio Giménez y Francisco Zafra, por abrirme las puertas de su laboratorio para poder hacer realidad este proyecto.

A los servicios de Microscopía Confocal y Citometría de Flujo de la Facultad de Medicina, así como también al servicio de secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

A mis compañeros de laboratorio Gema, José Luis, Carolina y Ana. Gracias por el apoyo y cariño durante todo este tiempo, y por ser mis amigos.

A mis padres, hermanas y hermano. Gracias por su apoyo y por creer en mí siempre.

A René, por haberme acompañado en esta aventura.

Índice

| | |
|--|-----------|
| ÍNDICE..... | 5 |
| ABREVIATURAS..... | 8 |
| RESUMEN | 12 |
| INTRODUCCIÓN | 14 |
| 1 EL NEUROTRANSMISOR FISIOLÓGICO ACETILCOLINA Y SUS RECEPTORES..... | 15 |
| 2 BIOGÉNESIS DE LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS..... | 25 |
| 3 EL RECEPTOR NICOTÍNICO NEURONAL DEL SUBTIPO α_7 | 32 |
| 4 EL GEN <i>CHRNA7</i> QUE CODIFICA PARA LA SUBUNIDAD NICOTÍNICA α_7 | 39 |
| 5 EL α_7 nAChR DE MACRÓFAGOS Y SU RELEVANTE PAPEL EN EL CONTROL DE LA INFLAMACIÓN..... | 50 |
| OBJETIVOS..... | 63 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 66 |
| 1 SOLUCIONES, REACTIVOS, MEDIOS DE CULTIVO, KITS COMERCIALES Y ANTICUERPOS EMPLEADOS.... | 67 |
| 2 CULTIVOS CELULARES..... | 69 |
| 3 TÉCNICAS DE ADN RECOMBINANTE PARA PREPARAR $\text{dup}\alpha_7$.pcDNA3.1/myc-His Y α_7 -HA.pcDNA3.1..... | 71 |
| 4 TÉCNICAS DE ADN RECOMBINANTE PARA LA PREPARACIÓN DE α_7 .pmaxGFP Y $\text{dup}\alpha_7$.pmCHERRY..... | 74 |
| 5 PROCEDIMIENTOS DE TRANSFECCIÓN..... | 76 |
| 6 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOBLOT..... | 77 |
| 7 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS Y DE PARTÍCULAS FAGOCITADAS POR FLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA CONFOCAL..... | 80 |
| 8 TRANSFERENCIA DE ENERGÍA ENTRE FLUOROCROMOS POR RESONANCIA DE FLUORESCENCIA (FRET) PARA ESTUDIAR COLOCALIZACIÓN DE SUBUNIDADES NICOTÍNICAS..... | 83 |
| 9 CITOMETRÍA DE FLUJO PARA ANALIZAR LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES EN MEMBRANA CELULAR..... | 84 |
| 10 ANÁLISIS DE CO-INMUNOPRECIPITACIÓN DE SUBUNIDADES NICOTÍNICAS..... | 85 |
| 11 CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TNF- α POR TÉCNICAS DE ELISA..... | 85 |
| 12 ENSAYO DEL GEN REPORTERO DE LUCIFERASA..... | 86 |
| 13 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA..... | 87 |
| 14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 88 |
| RESULTADOS | 89 |
| 1. OBTENCIÓN DE DIVERSAS CONSTRUCCIONES DE α_7 Y $\text{dup}\alpha_7$ PARA SU EXPRESIÓN HETERÓLOGA EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS..... | 90 |
| 2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN INDIVIDUAL DE α_7 -HA Y $\text{dup}\alpha_7$ -myc EN LA LÍNEA CELULAR GH4C1..... | 93 |
| 3 ANÁLISIS DE LA COLOCALIZACIÓN DE α_7 -HA Y $\text{dup}\alpha_7$ -myc EN CÉLULAS GH4C1 COTRANSFECTADAS CON AMBAS SUBUNIDADES NICOTÍNICAS..... | 95 |
| 4 LA SUBUNIDAD $\text{dup}\alpha_7$ SE ENSAMBLA CON SUBUNIDADES α_7 FORMANDO RECEPTORES HÍBRIDOS EN LA MEMBRANA DE CÉLULAS GH4C1..... | 96 |
| 5 LA INTERACCIÓN DE $\text{dup}\alpha_7$ Y α_7 EN CÉLULAS GH4C1 MODIFICA, EN SENTIDO OPUESTO, LA INCORPORACIÓN A MEMBRANA DE UNA Y OTRA SUBUNIDAD NICOTÍNICA..... | 98 |
| 6 LAS SUBUNIDADES α_7 Y $\text{dup}\alpha_7$ SE ENSAMBLAN ANÓMALAMENTE EN EL RE DE LAS CÉLULAS HEK293. 101 | |

| | | |
|----|--|------------|
| 7 | ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN ENDÓGENA DE α_7 Y FORÁNEA DE dup α_7 EN LA LÍNEA CELULAR RAW264.7..... | 102 |
| 8 | TRADUCCIÓN FUNCIONAL DE LA INTERACCIÓN α_7 Y dup α_7 A NIVEL DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS RAW264.7..... | 104 |
| 9 | LA EXPOSICIÓN PROLONGADA A NICOTINA INCREMENTA LA EXPRESIÓN DE IRAK-M EN MØ HUMANOS..... | 108 |
| 10 | EL EFECTO DE NICOTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE IRAK-M ES CONCENTRACIÓN- Y TIEMPO- DEPENDIENTE..... | 110 |
| 11 | EL RECEPTOR NICOTÍNICO DEL SUBTIPO α_7 DE MØ HUMANOS ESTÁ IMPLICADO EN EL EFECTO DE NICOTINA SOBRE IRAK-M..... | 111 |
| 12 | VÍA DE SEÑALIZACIÓN QUE CONECTA EL RECEPTOR α_7 CON IRAK-M..... | 114 |
| 13 | EL SILENCIAMIENTO DEL GEN DE IRAK-M REVIERTE PARCIALMENTE EL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE NICOTINA SOBRE TNF- α | 115 |
| 14 | EL PRETRATAMIENTO DE MØ HUMANOS CON NICOTINA INDUCE TOLERANCIA CELULAR ANTE UNA ESTIMULACIÓN CON LPS..... | 116 |
| 15 | LA TOLERANCIA INDUCIDA POR NICOTINA AUMENTA LA ACTIVIDAD FAGOCÍTICA DE LOS MØ HUMANOS A TRAVÉS DEL α_7 nAChR..... | 118 |
| | DISCUSIÓN..... | 119 |
| 1 | LAS SUBUNIDADES α_7 Y dup α_7 INTERACCIONAN FÍSICAMENTE ENTRE SI EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS..... | 121 |
| 2 | LA INTERACCIÓN ENTRE LAS SUBUNIDADES α_7 Y dup α_7 EN MACRÓFAGOS TIENE CONSECUENCIAS FUNCIONALES A NIVEL DE LA INFLAMACIÓN..... | 126 |
| 3 | EL REGULADOR NEGATIVO DE LA INFLAMACIÓN MEDIADA POR TLR (IRAK-M) ESTÁ TAMBIÉN IMPLICADO EN EL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE NICOTINA A TRAVÉS DEL α_7 nAChR..... | 127 |
| | CONCLUSIONES..... | 133 |
| | BIBLIOGRAFÍA..... | 136 |

Abreviaturas

| | |
|--------------------------------|--|
| a.a. | Aminoácido |
| αBgtx | Alfa-bungarotoxina |
| ACh | Acetilcolina |
| AChBP | Proteína de unión a acetilcolina |
| AChR | Receptor de acetilcolina |
| ADNc | Ácido desoxirribonucleico complementario |
| Akt | Serina/treonina proteína quinasa B |
| AMPC | Adenosín monofosfato cíclico |
| AP1 | Proteína activadora 1 |
| APC | Aloficocianina |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| BSA | Albúmina de suero bovino |
| CamKII | Ca ²⁺ /calmodulina proteína quinasa II |
| CCVD | Canales de calcio voltaje-dependientes |
| CICR | Liberación de calcio inducida por calcio |
| CMSP | Células mononucleares de sangre periférica |
| CREB | Factor de transcripción nuclear que se une a secuencias de ADN denominadas “elementos de respuesta a AMPC” |
| Ct | Ciclo umbral |
| DAMPs | Patrones moleculares asociados a daño |
| DAPI | 4,6-diamino-2-fenilindol |
| DMPP | Dimetil-4-fenil-piperazínico |
| dNTPs | Desoxirribonucleótidos trifosfato |
| ERK | Subfamilia de la MAPK regulada por señales extracelulares |
| FRET | Transferencia de energía entre fluorocromos |
| FITC | Fluoresceína-isotiocianato |
| HA | Epítipo de 9 a.a. perteneciente a la glucoproteína hemaglutinina |
| HEPES | N-[2-hidroxietil]-piperacino-N´-[2-ácido etanosulfónico] |
| HMGB1 | Proteína B1 del grupo de alta movilidad |
| HRP | Peroxidasa de rábano |
| IL | Interleuquina |

| | |
|--------------------------------|---|
| IPTG | Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido |
| IRAK-M | Serina/treonina quinasa-M asociada al receptor de interleuquina-1 |
| JAK2 | Tirosina quinasa Janus II |
| LB | Medio de Luria Bertani |
| LPS | Lipopolisacárido |
| mAChR | Receptor nicotínico muscular para la acetilcolina |
| MAPK | Serina/treonina quinasa activada por mitógenos |
| MEK | Quinasa que fosforila y activa a MAPK |
| M-CSFh | Factor estimulante de colonias de macrófagos humanos |
| MLA | Metilcaconitina |
| MØ | Monocitos humanos diferenciados a macrófagos |
| MyD88 | Factor de diferenciación mielóide 88 (proteína adaptadora entre los receptores Toll y la vía de señalización) |
| nAChR | Receptor nicotínico neuronal para la acetilcolina |
| NF-κB | Factor de transcripción nuclear kappa B |
| NGS | Suero normal de cabra |
| PMAP | Patrón molecular asociado a patógenos |
| P38^{MAPK} | Subfamilia de la MAPK que controla las respuestas celulares a las citoquinas y al estrés |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PI3K | Fosfoinositol 3-quinasa |
| PKA | Proteína quinasa A |
| PKC | Proteína quinasa C |
| PRS | Proteína de reconocimiento de señal |
| PVDF | Membrana de difluoruro de polivinilo |
| RE | Retículo endoplásmico rugoso |
| RIC-3 | Factor resistente a inhibidores de colinesterasa 3 |
| RNAsa | Ribonucleasa |
| RyRs | Receptores de rianodina |
| SDS/PAGE | Sodio dodecil sulfato/poliacrilamida |

| | |
|--------------------------------|---|
| SFB | Suero fetal bovino |
| siRNA | ARN pequeño de interferencia |
| STAT3 | Transductor de señal y activador de la transcripción 3 |
| TE | Tolerancia a endotoxina |
| TLRs | “Receptores tipo Toll”; los miembros de esta familia, identificados en mamíferos y plantas, presentan elevada homología con la proteína Toll de <i>Drosophila</i> |
| TLR-4 | Miembro de la familia de TLRs sensible a LPS |
| TNF-α | Factor de necrosis tumoral alfa |
| X-Gal | 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactopiranosido |

Resumen

Los receptores nicotínicos neuronales para la acetilcolina del subtipo α_7 (α_7 nAChR), se encuentran ampliamente distribuidos en SNC y periférico, así como en células de naturaleza no neuronal, como queratinocitos, astrocitos, linfocitos, microglía, monocitos y macrófagos. En neuronas, el α_7 nAChR presináptico modula la liberación de numerosos neurotransmisores, mientras que aquél situado postsinápticamente induce impulsos excitatorios en la correspondiente neurona. Adicionalmente, la activación de este receptor se ha asociado a fenómenos de plasticidad neuronal y supervivencia celular en SNC, mientras que en células no neuronales dicha activación regula procesos relacionados con la migración, neo-angiogénesis, proliferación, muerte celular e inflamación. Las múltiples funciones asignadas al α_7 nAChR permiten deducir que una deficitaria actividad y/o una reducida expresión del mismo hayan sido implicadas en la etiopatogenia de ciertas enfermedades como el Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia, neoplasias o en aquellas que cursan con una excesiva respuesta inflamatoria/inmune. Todo lo anterior justifica nuestro interés por el estudio de mecanismos de modulación endógena de este subtipo de receptor, así como por la identificación de nuevas vías de señalización implicadas en alguna de sus funciones.

En el año 2011, nuestro grupo demostró, por primera vez, el papel funcional del gen *CHRFAM7A* resultante de la duplicación parcial del gen *CHRNA7* que codifica para la subunidad nicotínica α_7 . El gen duplicado, solo presente en el genoma humano, codifica para una nueva subunidad nicotínica ($\text{dup}\alpha_7$) que actúa como regulador endógeno negativo de la actividad del α_7 nAChR en ovocitos de *Xenopus*. Dada la gran homología entre las secuencias peptídicas de α_7 y $\text{dup}\alpha_7$, no existe actualmente ningún anticuerpo específico capaz de distinguir entre una u otra subunidad nicotínica. Esta limitación ha impedido conocer el mecanismo por el que $\text{dup}\alpha_7$ ejerce su efecto sobre el α_7 nAChR en ovocitos, así como si dicho efecto también se produce en células de mamíferos y, en caso afirmativo, cual es su posible repercusión funcional en células que expresan endógenamente α_7 y $\text{dup}\alpha_7$, como las neuronas o los macrófagos humanos. En esta tesis se ha tratado de dar respuesta a estas cuestiones mediante la preparación de diversas construcciones conteniendo los ADNc de α_7 y $\text{dup}\alpha_7$ marcados con diferentes epítomos o proteínas de fusión, utilizando para ello técnicas de ADN recombinante. Tras expresar estas construcciones en varias líneas celulares de mamíferos, se ha recurrido a utilizar una combinación de técnicas, incluyendo las de biología celular y molecular, bioquímicas, inmunocitoquímica y de microscopía confocal, con objeto de analizar la interacción de las subunidades nicotínicas expresadas. Nuestros resultados revelan que ambas subunidades interactúan físicamente entre sí generando receptores mixtos $\alpha_7/\text{dup}\alpha_7$ en la membrana celular así como en el RE. Más aún, nuestros resultados permiten constatar que la formación de estos receptores mixtos en la membrana de células inmunes transfectadas con $\text{dup}\alpha_7$ tiene consecuencias funcionales; así, el efecto antiinflamatorio de nicotina observado tras la activación del α_7 nAChR homomérico es parcialmente revertido cuando se trata del receptor mixto $\alpha_7/\text{dup}\alpha_7$.

Adicionalmente, en esta tesis se ha logrado identificar una nueva vía de señalización inducida por nicotina en macrófagos humanos. Esta vía, iniciada por la activación del α_7 nAChR y la consiguiente señalización a través de JAK2/STAT3/PI3K, conduce a la sobreexpresión de la serina/treonina quinasa-M asociada al receptor de interleuquina-1 (IRAK-M), un regulador negativo de la respuesta inmune innata mediada por TLR. Nuestros datos demuestran que el incremento de expresión de IRAK-M está implicado en el efecto antiinflamatorio así como en la generación de un estado de “tolerancia” inducido por nicotina en macrófagos. Ambos efectos de nicotina sobre los macrófagos pueden explicar las diferencias de riesgo y evolución clínica observadas entre pacientes fumadores y no fumadores que sufren ciertas patologías infecciosas o inmunes.

Introducción

1 EL NEUROTRANSMISOR FISIOLÓGICO ACETILCOLINA Y SUS RECEPTORES.

1.1. Localización de sinapsis colinérgicas, clasificación y distribución de receptores colinérgicos a nivel periférico y central.

La acetilcolina (ACh) es el neurotransmisor fisiológico liberado por todas las fibras parasimpáticas postganglionares, así como por unas pocas fibras simpáticas postganglionares, como las de las glándulas sudoríparas (Fig. 1). Adicionalmente, la ACh es el transmisor químico de las fibras preganglionares simpáticas y parasimpáticas, de los nervios motores de músculo estriado y de muchas neuronas del SNC.

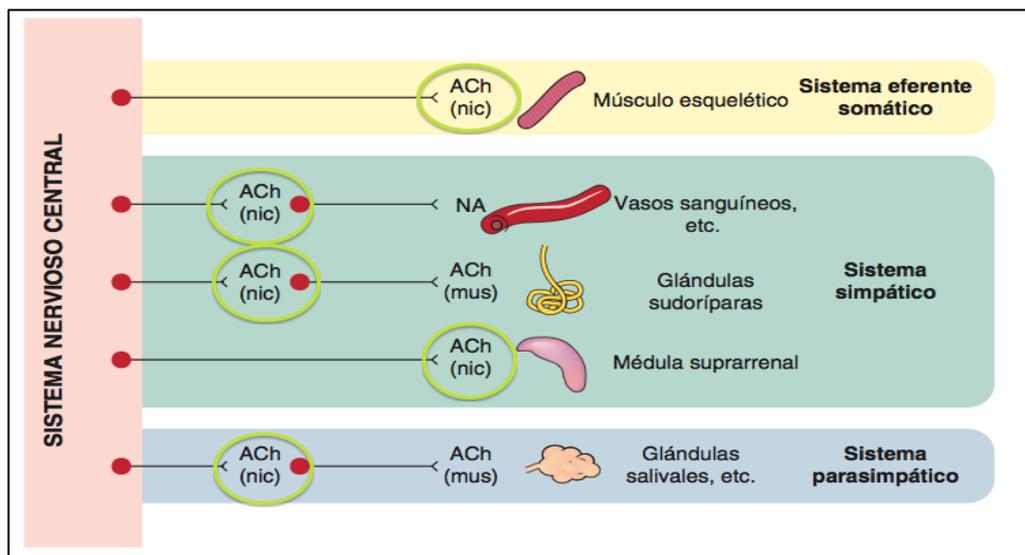


Figura 1.- Distribución de sinapsis colinérgicas periféricas y receptores colinérgicos activados por la ACh liberada.

En todas estas sinapsis, la ACh liberada activa receptores colinérgicos específicos que pueden estar ubicados tanto post- como presinápticamente. Existen dos grandes grupos de receptores colinérgicos distribuidos periféricamente y en SNC, los receptores muscarínicos y nicotínicos, cuya distribución periférica y central se refleja en las figuras 1 y 2, respectivamente. Se observa que ciertas regiones cerebrales solo expresan receptores muscarínicos (mesencéfalo, bulbo y protuberancia), otras regiones (sustancia negra, locus coeruleus y septum) solo nicotínicos, mientras que ambos subtipos de receptores están presentes en el estriado, corteza cerebral, hipocampo,

hipotálamo y cerebelo. Inicialmente, estos receptores colinérgicos fueron identificados en células de tipo neuronal, además de en músculo esquelético. Sin embargo, en los últimos años, ha podido constatarse la presencia de estos receptores en células no neuronales, a los que nos referiremos más adelante.

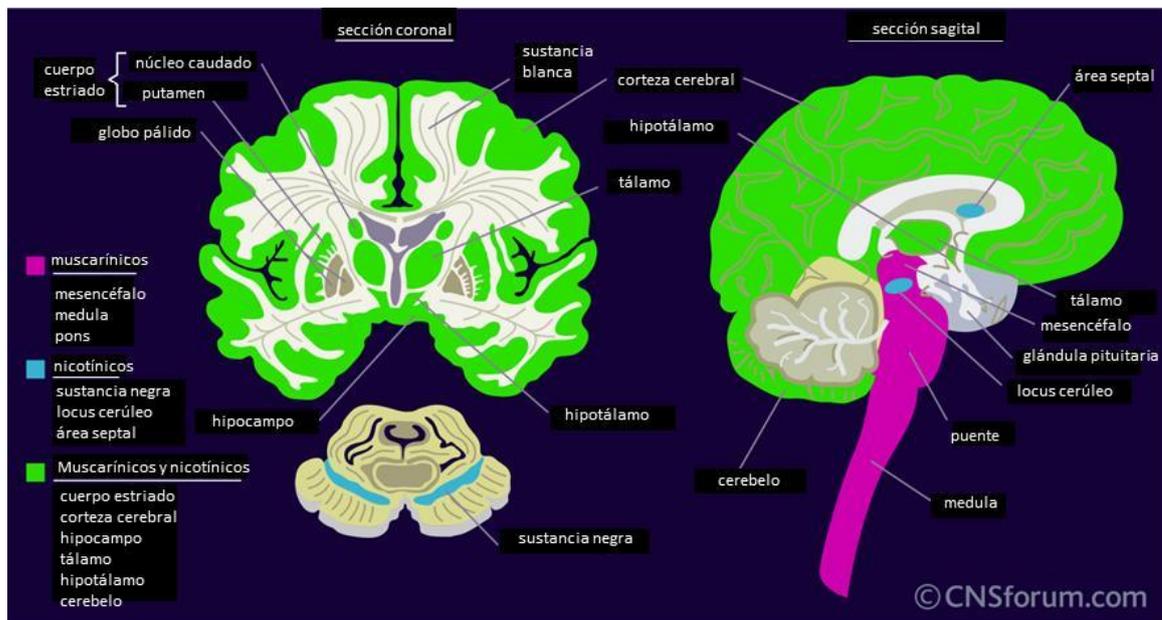


Figura 2.- Distribución de receptores colinérgicos en cerebro. Tomado de *Molecular biology, pharmacology and brain distribution of muscarinic and nicotinic receptor subtypes*. The American College of Neuropsychopharmacology. www.acnp.org/g4/GN401000010/CH010.html Accessed on 18 January 2011.

1.2. Estructura pentamérica del receptor colinérgico nicotínico muscular e identificación de nuevos subtipos de receptores nicotínicos en células PC12, ganglios y SNC.

El primer receptor colinérgico aislado y purificado fue el receptor nicotínico para ACh de tipo muscular (mAChR) (Briley y Changeux., 1977; Sobel y col., 1977). Este receptor recibió dicha denominación en base a su capacidad para ser activado por el alcaloide nicotina, además de por el neurotransmisor endógeno ACh. En la purificación del mAChR fue decisiva la disponibilidad de toxinas que se unían a él con gran afinidad y especificidad, así como su alto nivel de expresión en el órgano eléctrico del pez *Torpedo marmorata*, tejido que constituyó la fuente inicial para su aislamiento. También es relevante señalar la identificación y cristalización de proteínas de unión a ACh (AChBPs) presentes en el caracol *Lymnaea stagnalis* y en los crustáceos *Aplysia californica* y *Bulinus truncatus*; estas proteínas han aportado una información valiosa

sobre la estructura de los AChRs (Smit y col., 2001, 2003; Celie y col., 2005; Hansen y col., 2005).

El mAChR pertenece a la superfamilia *Cys-loop* de receptores asociados a un canal iónico activado por ligando. También pertenecen a esta superfamilia los receptores para glicina, glutamato (NMDA, AMPA y kainato), ácido gamma-aminobutírico (GABA_A y GABA_C) y serotonina (5HT₃), todos los cuales proceden de un ancestro común. Todos estos receptores están constituidos por 5 subunidades ensambladas alrededor de un poro iónico que, tras la activación del receptor, permite la entrada de iones al interior celular. En el caso del mAChR (Fig. 3), han sido identificadas las 5 subunidades del pentámero (2 α_1 , 1 β_1 , 1 δ y 1 γ), con la subunidad γ reemplazada por la ϵ en vertebrados adultos (Brisson y Unwin., 1984; Kubalek y col., 1987). El clonaje de los genes que codifican para las distintas subunidades del mAChR y su posterior expresión en sistemas heterólogos ha permitido conocer la estructura terciaria de cada subunidad, a la vez que caracterizar biofísica y farmacológicamente el receptor expresado (Mishina y col., 1984; Takahashi y col., 1985). La primera subunidad del mAChR cuya secuencia fue identificada fue la α_1 , constituida por 482 aminoácidos (Devillers-Thiery y col., 1983). Esta subunidad presenta un voluminoso dominio hidrofílico N-terminal extracelular cuya estructura secundaria es, en su mayor parte, de lámina plegada β . En este dominio extracelular se localiza una secuencia de 13 aminoácidos flanqueada por una pareja de dos cisteínas que se unen mediante un puente disulfuro (Cys-Cys); esta zona es de enorme importancia ya que contiene el principal componente del sitio de unión del ligando al receptor (Jones y Sattelle, 2010).

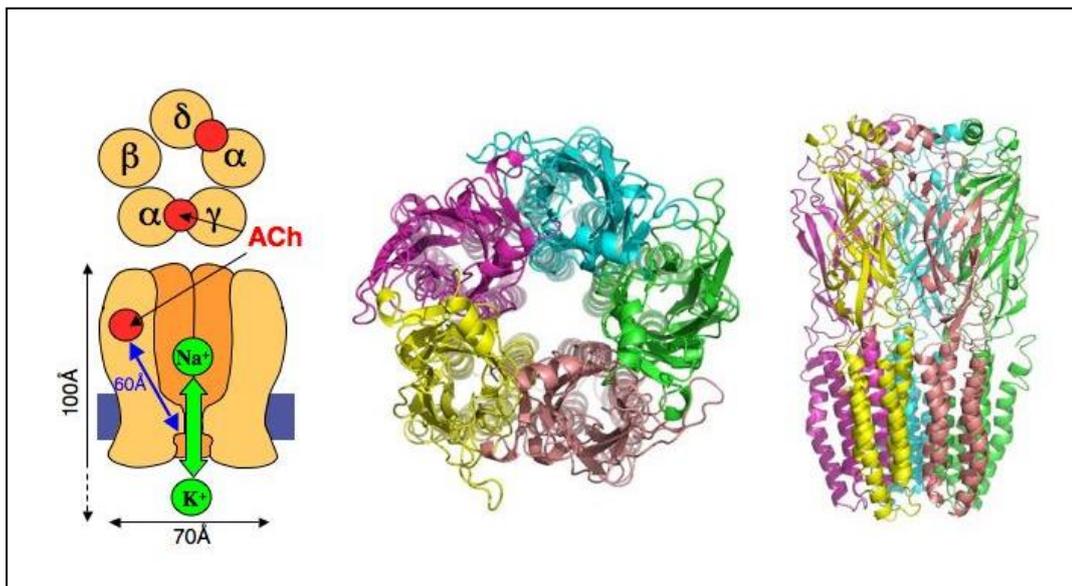


Figura 3.- Izquierda: representación esquemática de un AChR muscular (mAChR), vista desde la hendidura sináptica (parte superior) y lateralmente (membrana representada en azul). También aparecen representados los sitios de unión de ACh (rojo) así como el canal iónico asociado al receptor (flecha verde). Centro y derecha: modelo de estructura tridimensional del complejo pentamérico de un receptor nicotínico en base a los datos estructurales obtenidos de AChBP y del AChR del Torpedo. (Figura tomada de Pierre-Jean Corringer and Jean-Pierre Changeux, 2008).

Durante muchos años, el mAChR fue considerado como el único miembro de la familia de receptores colinérgicos nicotínicos. Sin embargo, se sabía de la existencia de otros tipos de receptores nicotínicos, expresados en ganglios y células cromafines, que mostraban una sensibilidad farmacológica diferente a la de los receptores musculares, lo cual hacía sospechar que esta familia de receptores debía ser más compleja de lo esperado en un principio. Así, la alfa-bungarotoxina (α Bgtx), una α -neurotoxina procedente del veneno de la víbora *Bungarus multicinctus*, era capaz de bloquear los mAChRs de la placa neuromuscular pero no los receptores nicotínicos presentes en los ganglios simpáticos, células cromafines de la médula adrenal o células PC12 de feocromocitoma de rata. En 1986, James W. Patrick y Stephen F. Heinemann, utilizando como sonda un ADNc de la subunidad α_1 del mAChR de ratón, consiguieron clonar y secuenciar una nueva subunidad nicotínica a partir de células PC12 (Boulter y col., 1986). Esta nueva subunidad, denominada α_3 , se erigió como el primer miembro de una larga familia de subunidades del receptor nicotínico neuronal para la ACh (nAChR) que se fueron identificando en los años sucesivos.

Hasta la fecha, han sido identificado en vertebrados un total de 17 genes que codifican otras tantas subunidades del mAChR (α_1 , β_1 , δ , γ y ϵ) y de los nAChRs (α_2 - α_{10} , β_2 - β_4) (Colombo y col., 2013), siendo las subunidades α_9 y α_{10} las últimas en ser

incorporadas a esta lista. Todas estas subunidades son expresadas en humanos y otros mamíferos, excepto la α_8 que solo ha sido identificada en aves (Millar y Gotti, 2009). La Figura 4 muestra un cariotipo humano normal con la localización cromosómica de los genes que codifican para diferentes subunidades nicotínicas. Se asume que estos genes han divergido progresivamente de un gen ancestral común a través de procesos de duplicación y mutaciones génicas, conduciendo a la diversidad actual de genes de subunidades nicotínicas encontradas en humanos. Las subunidades del nAChR son clasificadas como α o no- α (o β). Las subunidades α se caracterizan por poseer 2 cisteínas adyacentes en la región N-terminal, las cuales son homólogas a las identificadas en las posiciones 192 y 193 de la secuencia peptídica de la subunidad α_1 del mAChR; en dicha región se ubica la zona de unión del ligando endógeno ACh (Sine y col., 2002). Las subunidades estructurales no α (β_2 - β_4) se caracterizan por carecer de estas dos cisteínas vecinas, por lo tanto, no son capaces de unir el ligando. No obstante, estas subunidades estructurales tienen la capacidad de poder reemplazar a la subunidad β_1 del mAChR dando lugar a un receptor funcional (Changeux y Edelstein, 1998; Le Novère y Changeux, 1995).

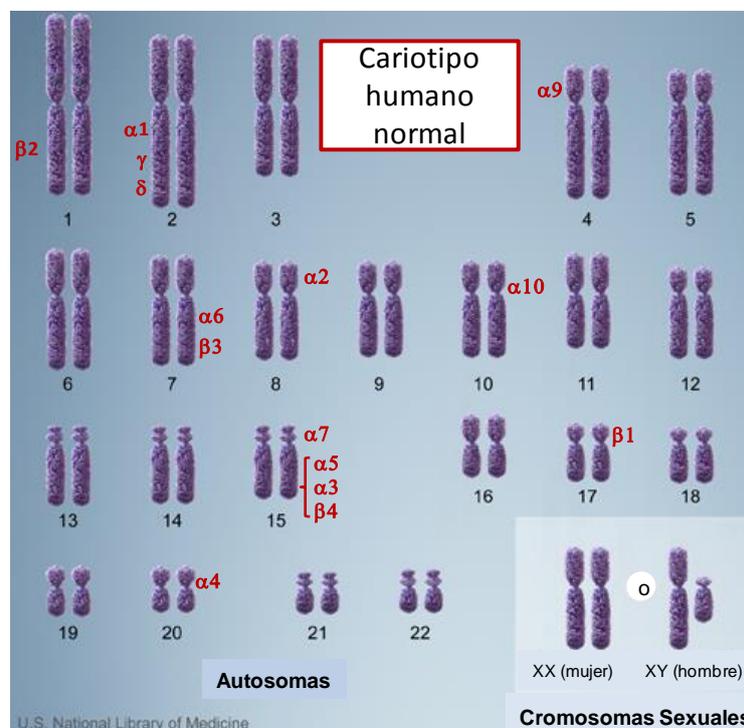


Figura 4.- Cariotipo humano típico con la localización de los genes que codifican para las subunidades nicotínicas.

Los requerimientos mínimos de subunidades nicotínicas que deben combinarse para constituir nAChRs funcionales han podido establecerse gracias a la utilización de diferentes sistemas de expresión heteróloga de proteínas, entre los cuales se encuentra el de los ovocitos de la rana de origen africano *Xenopus laevis*. Utilizando estos modelos de expresión, se ha podido constatar que las 5 subunidades neuronales pueden combinarse entre sí para formar dos clases de nAChRs: los homoméricos conteniendo un solo tipo de subunidad nicotínica (α_7 o α_9), y los heteroméricos que contienen una combinación de subunidades α y β (α_2 - α_6 , y β_2 - β_4) (Dani y Bertrand, 2007) (Fig. 5). La α -Bgtx es capaz de distinguir entre estas dos clases de nAChRs, ya que mientras que los homoméricos son sensibles al efecto bloqueante de la toxina, los heteroméricos son insensibles a la misma (Colombo y col., 2013).

Los subtipos de nAChRs más abundantes en cerebro son los homoméricos α_7 de baja afinidad para el agonista y los heteroméricos $\alpha_4\beta_2^*$ de alta afinidad para el mismo. El asterisco en la nomenclatura del receptor indica que otras subunidades nicotínicas no identificadas pueden también estar formando parte del complejo pentamérico. De hecho, los nAChRs heteroméricos son estructuras muy complejas, las que pueden contener dos o tres subunidades α co-ensambladas y dos o tres subunidades β . Este es el caso del $\alpha_4\beta_2$ que puede estar constituido por dos subunidades α y tres β [$(\alpha_4)_2(\beta_2)_3$], o por tres subunidades α y dos β [$(\alpha_4)_3(\beta_2)_2$] (Zwart y Vijverberg, 1998; Nelson y col., 2003; Moroni y col., 2006). Curiosamente, cada una de estas dos estequiometrias proporciona al receptor diferente sensibilidad para el agonista: alta sensibilidad en el primer caso ($EC_{50} = \approx 1 \mu\text{M ACh}$), y baja en el segundo ($EC_{50} = \approx 100 \mu\text{M ACh}$) (Buisson y Bertrand, 2001; Nelson y col., 2003; Moroni y col., 2006). Adicionalmente, más de un tipo de subunidad α y/o β pueden formar parte de un mismo nAChR funcional. Por ejemplo, el subtipo identificado en las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo contiene subunidades $\alpha_4\beta_2$ co-ensambladas con subunidades α_6 y β_3 para formar el $\alpha_4\alpha_6\beta_2\beta_3^*$ nAChR (Salminen y col., 2004, 2007; Zhao-Shea y col., 2011; Liuy col., 2012). Esta gran diversidad de subunidades nicotínicas formando parte de un único nAChR funcional permite intuir la existencia de una gran variedad de subtipos de

nAChR, cada uno con propiedades farmacológicas y biofísicas distintas (McGehee y Role, 1995; Gotti y col., 2007).

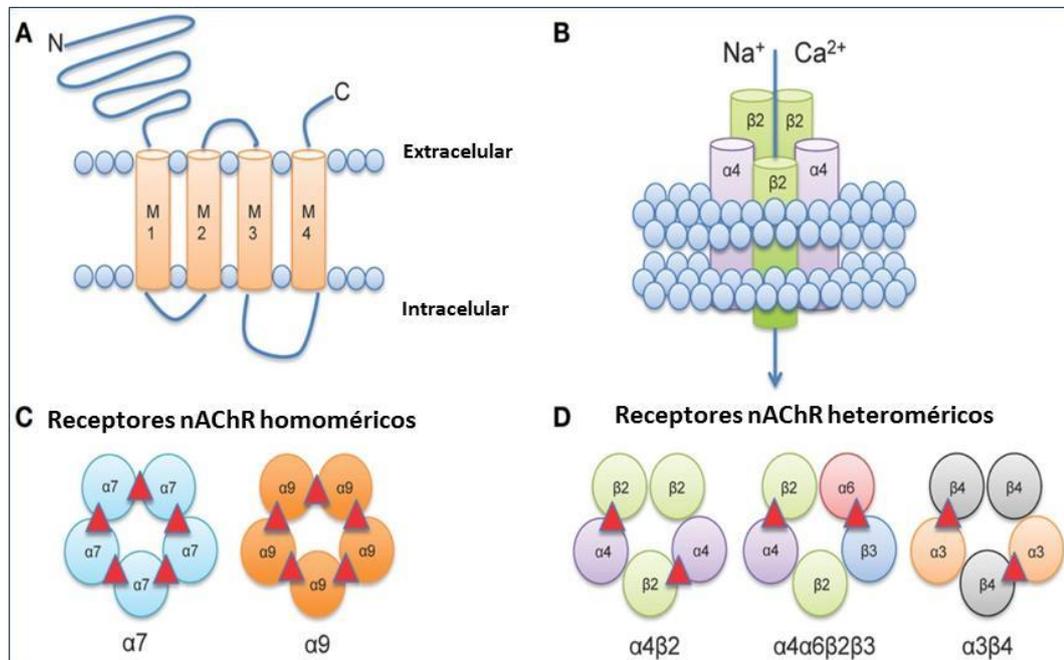


Figura 5.- Estructura y estequiometría de los diferentes subtipos de receptores nicotínicos neuronales para la ACh (nAChR). A) Disposición de una subunidad del nAChR en la membrana celular. Cada subunidad contiene 4 dominios transmembrana (M1-M4), dos regiones extracelulares amino- y carboxi-terminal, y un gran bucle intracelular entre M3-M4 de longitud variable. B) Cinco subunidades nicotínicas ensambladas formando el nAChR funcional. C) Receptores homoméricos formados por un solo tipo de subunidad α , usualmente con baja afinidad por el agonista. Hasta la fecha, solo las subunidades α_7 o α_9 pueden formar receptores homoméricos funcionales en mamíferos. D) La mayoría de los nAChRs con alta afinidad por el agonista son heteroméricos y están constituidos por la combinación de subunidades α y β . Es interesante resaltar que varios tipos de subunidades α pueden co-ensamblarse con varios tipos de subunidades β en la estructura pentamérica del nAChR (ilustrado aquí como $\alpha_4\alpha_6\beta_2\beta_3$). Los triángulos rojos representan los lugares de unión de la ACh. (Ilustración modificada tomada de Linzy Hendrickson y col., 2013).

1.3. Estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de los nAChRs.

Como acaba de ser mencionado, los nAChRs son complejos proteicos multiméricos formados por la asociación de 5 subunidades idénticas (homómeros) o diferentes (heterómeros), con pesos moleculares comprendidos entre 40 y 58 kDa, situadas simétricamente alrededor de un eje perpendicular a la membrana celular. Al ensamblarse, las subunidades conforman en su centro un poro iónico permeable a diferentes iones como Na^+ , K^+ y, en algunos subtipos de nAChRs (p.e., el receptor homomérico α_7) el ión Ca^{2+} .

La estructura terciaria que cada subunidad del nAChR está esquematizada en la Figura 5A, y se muestra con mayor detalle en la Figura 6. Esta estructura está constituida por: 1º) un largo dominio NH₂-terminal extracelular de \approx 200 aminoácidos; 2º) cuatro dominios transmembrana (M1-M4); 3º) un largo bucle intracelular entre los dominios M3 y M4 en el que predominan las hélices α y que constituye la zona en donde reside la mayor variabilidad entre las distintas subunidades (Colombo y col., 2013); y 4º) un corto segmento C-terminal extracelular (De Jonge y Ulloa, 2007). La estructura secundaria del dominio NH₂-terminal es similar en todas las subunidades, con un dominio α -hélice en su extremo inicial y un núcleo central constituido por 10 beta láminas conformando un β -sándwich con varios bucles uniendo las láminas. Este dominio contiene elementos fundamentales para la apertura del poro iónico así como los sitios de unión de los agonistas y de los antagonistas competitivos. Además, en los primeros 25 aminoácidos del dominio NH₂-terminal de todas las subunidades nicotínicas se localiza la zona del “péptido señal”, zona clave para que la proteína de nueva síntesis migre convenientemente a la membrana celular. El bucle intracelular es crítico para la expresión funcional de los nAChRs, ya que está implicado no solo en el correcto plegamiento, ensamblaje y tráfico de los receptores maduros hacia la membrana plasmática, sino que también interviene en la modulación de la actividad de estos receptores a través de cambios post-transduccionales mediados por procesos de fosforilación (Mukherjee y col., 2009).

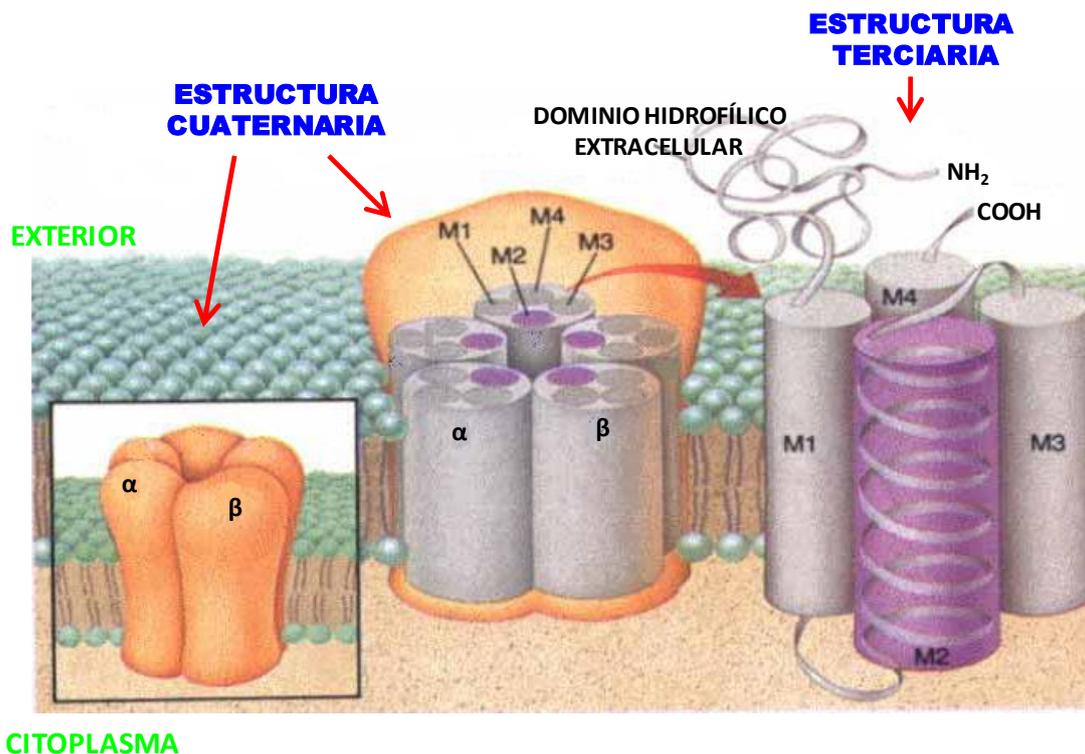


Figura 6.- Modelo representativo de un AChR nicotínico neuronal (nAChR) heteromérico. Izquierda y centro: estructura cuaternaria del receptor con las 5 subunidades ensambladas alrededor del poro iónico. Derecha: estructura terciaria de una subunidad nicotínica prototipo, con los cuatro segmentos transmembrana, M1, M2, M3, M4 y el largo dominio hidrofílico NH₂-terminal extracelular donde, en el caso de las subunidades α, se localizan los sitios de unión del agonista. (http://www.weizmann.ac.il/home/samson/aster_files/image002.gif)

1.4. Localización y distribución de los diferentes subtipos de nAChRs.

Los nAChRs presentan una amplia distribución en SNC y periférico, donde se pueden localizar tanto pre-, como post- y/o perisinápticamente. Cuando el nAChR es expresado presinápticamente, su activación produce la modulación de la transmisión sináptica mediada por ACh, noradrenalina, dopamina, glutamato y GABA (Paterson y Nordberg, 2000; Zouridakis y col., 2009). Cuando la ubicación del receptor es postsináptica, su estimulación activa una serie de señales intracelulares implicadas en la excitabilidad celular, la expresión génica, la diferenciación celular y la supervivencia. La Figura 7 muestra los principales subtipos de nAChRs identificados en SNC. Puede observarse la gran pluralidad de subtipos expresados, siendo los receptores homoméricos α_7 y los heteroméricos $\alpha_4\beta_2$, los que presentan mayor nivel de expresión.

Como se ha mencionado en un epígrafe anterior, también se han identificado nAChRs en células no neuronales, incluyendo diversos tipos de células endocrinas, epiteliales o del sistema inmune (Gahring y col., 2005; Zouridakis y col., 2009; Colombo y col., 2013).

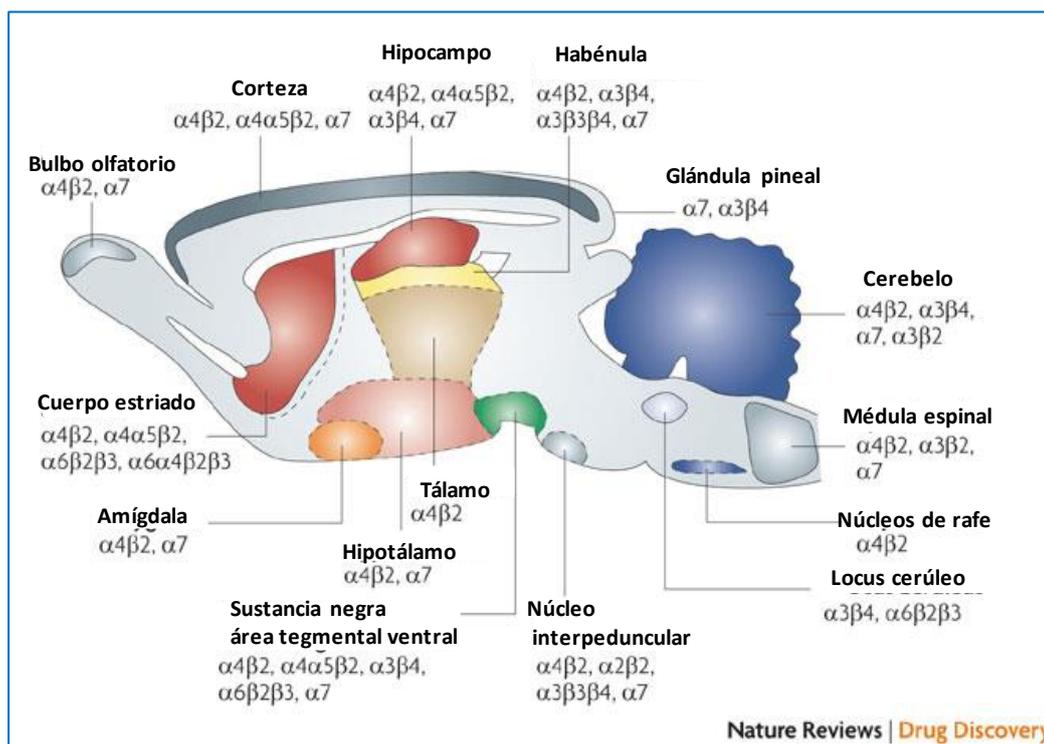


Figura 7.- Principales subtipos de nAChRs y su distribución en SNC (Figura modificada tomada de Taly y col., 2009).

2 BIOGÉNESIS DE LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS.

Como corresponde a su compleja estructura, la biosíntesis y maduración de un receptor nicotínico hasta convertirse en un receptor funcional es un proceso laborioso, que se desarrolla en varias etapas. Estas etapas incluyen la síntesis, el plegamiento y el ensamblaje de las subunidades para constituir la estructura pentamérica del receptor, así como el transporte de éste hacia la membrana celular (Green y Millar, 1995). Todo el proceso biogénico del receptor ha sido estudiado en detalle utilizando sistemas de expresión “*in vitro*” (Anderson y Blobel, 1981; Shtrom y Hall, 1996), líneas celulares musculares (Gu y col., 1989), y sistemas de expresión heteróloga, como los ovocitos de *Xenopus* o las células de mamífero transfectadas (Gu y col., 1991; Saedi y col., 1991). Los resultados obtenidos hasta la fecha han permitido aclarar algunos aspectos de la biogénesis del receptor, permaneciendo oscuros otros, como los mecanismos que regulan la especificidad del ensamblaje entre las subunidades.

2.1. Síntesis, plegamiento y maduración de las subunidades nicotínicas.

Cada una de las subunidades que conforman el receptor nicotínico es sintetizada, de manera independiente, como una cadena polipeptídica individual. Al igual que el resto de las proteínas que deben empaquetarse en vesículas de secreción o trasladarse a la membrana celular, la síntesis de las subunidades nicotínicas se lleva a cabo en el retículo endoplásmico rugoso (RE) gracias a los ribosomas adosados a la membrana reticular (Anderson y Blobel, 1981). A medida que es elongada, la cadena polipeptídica es translocada al interior del RE mediante un mecanismo típico dependiente de una “Partícula de Reconocimiento de la Señal” (PRS) que, como indica su nombre, reconoce y se une a una secuencia “péptido señal” del nuevo polipéptido sintetizado. La unión del PRS al polipéptido es identificada por un receptor específico situado en la membrana del RE, siendo esta la señal que inicia la translocación del polipéptido (Rapoport, 1992). Una vez en la luz reticular, la secuencia “péptido señal” es cortada y eliminada, al tiempo que la cadena polipeptídica encuentra el ambiente propicio para comenzar su proceso de maduración.

El proceso de maduración comienza con el plegamiento de la cadena como resultado de la exposición del péptido a la acción de diversas proteínas que producen

modificaciones post-traduccionales sobre el mismo. Estas modificaciones incluyen procesos de glicosilación, formación de puentes disulfuro, palmitoilación, isomerización de prolina y escisión proteolítica (Millar y Harkness, 2008).

El proceso de glicosilación se inicia durante la propia síntesis proteica. Consiste en la incorporación de un núcleo de oligosacáridos, con alto contenido en manosa, sobre residuos de asparagina situados en posiciones determinadas del dominio NH₂-terminal de la subunidad. Este núcleo de oligosacáridos es modificado posteriormente en el aparato de Golgi (Kornfeld y Kornfeld, 1985; Chen y col., 1998). Se ha demostrado que la adecuada glicosilación es un requisito necesario para el correcto ensamblaje de las subunidades de los AChRs, tanto musculares como neuronales (Millar y Harkness, 2008). También es fundamental para el correcto plegamiento y ensamblaje de las subunidades nicotínicas la formación de puentes disulfuro entre residuos próximos de cisteína del dominio NH₂-terminal de la subunidad. Una deficiente formación de puentes disulfuro origina un plegamiento incorrecto de la subunidad nicotínica α_7 en algunas líneas celulares de mamífero (Rakhilin y col., 1999). También se ha podido comprobar que la subunidad α_1 del mAChR recién sintetizada es incapaz de unir α -Bgtx o agonistas de alta afinidad por el receptor; sin embargo, 15-30 minutos más tarde, tras un proceso de maduración que conduce a cambios conformacionales, la subunidad se torna sensible a la toxina (Merlie y Lindstrom, 1983; Carlin y col., 1986).

El plegamiento de las subunidades nicotínicas depende directamente de su secuencia peptídica (Lee y col., 2009). Se trata de un proceso poco eficiente; sólo una baja proporción de las subunidades sintetizadas se pliegan correctamente. En el caso de células musculares, esta proporción es del 30% respecto al total de subunidades sintetizadas (Merlie y Lindstrom, 1983), mientras que este valor es aún menor en fibroblastos transfectados con subunidades del receptor nicotínico de *Torpedo* (Ross y col., 1991). No está clara aún la razón por la que existe un remanente tan elevado de subunidades mal plegadas en la célula. Es probable que, para completar el proceso de plegamiento, las subunidades requieran contactos posteriores con otras subunidades nicotínicas durante la fase de oligomerización (Green y Claudio, 1993; Green y Millar, 1995; Green y Wanamaker, 1997). En cualquier caso, solo las subunidades nicotínicas

correctamente plegadas y posteriormente ensambladas en el complejo receptoral, aproximadamente el 30% de las sintetizadas (Colombo y col., 2013), abandonan el RE, transitando por el aparato de Golgi para llegar finalmente a la membrana celular (Corringer y col., 2006). El resto de subunidades sin ensamblar son retenidas en el RE y finalmente degradadas (John, 2009).

2.2. Chaperonas y proteínas asociadas a los nAChRs.

Es conocido que las subunidades nicotínicas del nAChR se pueden unir a ciertas chaperonas, como las proteínas BiP (proteína de unión de la familia de las chaperonas Hsp70 localizada en el RE), el RIC-3 (factor de resistencia a los inhibidores de la colinesterasa), ERp75 (proteína del RE de 75 kDa), calnexina (Albuquerque y col., 2009). Estas chaperonas se unen a los precursores de las subunidades con la finalidad de favorecer su plegamiento y ensamblaje, así como para monitorizar el estado glicosilado de las mismas. Aparte de estas proteínas específicas, se ha propuesto que la nicotina podría actuar como una chaperona al interactuar con las subunidades nicotínicas en el RE, favoreciendo su ensamblaje y aumentando el número de nAChRs que acceden a la membrana celular (Corringer y col., 2006; Colombo y col., 2013). La Tabla 1 muestra la localización de las principales chaperonas que se unen a subunidades nicotínicas, así como el resultado funcional de dicha unión.

En el proceso de maduración de los nAChRs del subtipo α_7 , se ha descrito que es fundamental la asociación de las subunidades α_7 con RIC-3, proteína de membrana que se localiza en el RE y que fue originalmente identificada en el nematodo *C. elegans* (Halevi y col., 2002). En contraste con otras chaperonas como BiP y calnexina, RIC-3 tiene una elevada selectividad para interactuar con los nAChRs, a pesar de que también se puede unir a otros receptores ionotrópicos de la misma familia, como los receptores de serotonina 5-HT₃. La proteína RIC-3 interactúa con intermediarios de subunidades α_7 nAChR en fase de ensamblaje facilitando este proceso (Treinin, 2008). Es importante señalar que los efectos de RIC-3 sobre algunos receptores dependen del sistema experimental de expresión. Así, en células tsA201 RIC-3 aumenta la expresión del $\alpha_4\beta_2$ nAChR (línea celular derivada de las células embrionarias de riñón humano HEK293), mientras que reduce dicha expresión en ovocitos y células COS; al

colocalizarse con el receptor formado agregados no funcionales. El mecanismo por el cual RIC-3 ejerce efectos tan dispares sobre diferentes subtipos de nAChRs se desconoce, pero es probable que la proteína interactúe con varios dominios de la estructura del receptor produciendo diferentes acciones (Millar y Harkness, 2008; Albuquerque y col., 2009). Así, basta con la unión de RIC-3 a un único residuo del dominio transmembrana M1 del receptor 5-HT3 para disminuir la expresión de este receptor, mientras que la chaperona requiere unirse a todo el bucle intracelular entre M3 y M4 de la subunidad α_7 para que se produzca el aumento de expresión de este receptor (Castillo y col., 2005).

Tabla1: Principales chaperonas que interactúan con subunidades nicotínicas neuronales o con el AChR muscular (mAChR). (Tomado de Colombo y col., 2013).

| CHAPERONA | FUNCIÓN | LOCALIZACIÓN | receptor/subunidad |
|--------------------|--|--------------|--|
| BiP/GRP78 | Ensamblaje y plegamiento de subunidades | lumen del RE | mAChR |
| ERp57 | Ensamblaje y plegamiento de subunidades | lumen del RE | mAChR |
| Calnexina | Ensamblaje y plegamiento de subunidades | membrana RE | AChR |
| RIC-3 | Ensamblaje y plegamiento de subunidades | lumen del RE | $\alpha_3, \alpha_4, \alpha_7, \alpha_8, \alpha_9, \beta_2, \beta_4$ |
| Ubiquilin-1 | Degradación proteosomal | citoplasma | $\alpha_3, \alpha_4, \beta_4$ |
| UBXD-4 | Degradación proteosomal | RE y Golgi | α_3, α_4 |
| Rer1 | Incremento del tráfico hacia membrana plasmática | Golgi | mAChR |
| VILIP-1 | Incremento del tráfico hacia membrana plasmática | Golgi | α_4 |

2.3. Ensamblaje de subunidades y tráfico de receptores a la membrana celular.

El ensamblaje de subunidades nicotínicas para constituir el complejo pentamérico del receptor es un requisito previo para la salida de éste desde el RE hacia el Golgi, y de ahí hacia la membrana celular (Gu y col., 1991). Se trata de un proceso complejo que depende de la propia estructura de las subunidades que conforman el receptor y del tipo celular en el que éste va a ser expresado. Parece claro que existen unas determinadas normas que dirigen el ensamblaje de subunidades nicotínicas ya que, entre las múltiples combinaciones posibles de subunidades que podrían formar el pentámero, sólo se producen algunas de ellas. Por ejemplo, en neuronas de hipocampo, la gran mayoría de

los receptores funcionales identificados son receptores heteroméricos $\alpha_4\beta_2$ u homoméricos α_7 . Esto ocurre también en cerebro y ganglio con las subunidades α_3 , α_4 , β_2 y β_4 , en donde existe preferencia por la combinación $\alpha_4\beta_2$ y $\alpha_3\beta_4$, respectivamente.

La célula dispone de mecanismos intracelulares de control para garantizar que solamente sean expresados aquellos nAChRs con las subunidades ensambladas de acuerdo a una determinada estequiometría. Uno de estos mecanismos es la propia estructura primaria de la subunidad, que asegura su adecuado plegamiento y la interacción preferencial con determinadas subunidades. En este sentido, varias secuencias nucleotídicas del dominio NH₂-terminal o del bucle intracelular que une los dominios M3 y M4 tienen especial importancia. Así, en lo que respecta al dominio NH₂-terminal, los estudios con subunidades α_7 recombinantes demuestran que la región comprendida entre los aminoácidos 23 (glicina) y 46 (asparagina) contiene los residuos necesarios para la correcta asociación de subunidades para conformar el receptor homomérico. También se han realizado mutaciones de la subunidad α_7 bovina en donde se demuestra que la eliminación de la α -hélice del extremo NH₂-terminal o del bucle entre las láminas β_2 y β_3 reduce la expresión de receptores como consecuencia de un deficitario ensamblaje de subunidades (Castillo y col., 2009; Criado y col., 2010). En relación al bucle intracelular que une los dominios M3 y M4, ha sido demostrado su decisivo papel en las interacciones proteína-proteína implicadas en el ensamblaje de subunidades del nAChR. Al menos 12 motivos funcionales diferentes se han encontrado en este largo bucle intracelular en la subunidad δ ; cada uno de los cuales tiene potencial para regular el ensamblaje y expresión de los mAChRs de la unión neuromuscular (Albuquerque y col., 2009). Aunque el ensamblaje de subunidades puede realizarse cuando gran parte de esta región se ha eliminado, la eficiencia de este proceso se reduce considerablemente (Numa, 1986).

También merece la pena resaltar el hallazgo de que diversas mutaciones en el bucle intracelular que une los dominios M3 y M4 de ciertas subunidades nicotínicas producen cambios importantes, de tipo farmacológico y funcional, en el receptor. En este sentido, se ha observado que la mutación en ese dominio de la subunidad (β_2^*) produce receptores $\alpha_4\beta_2^*$ que presentan cambios en la sensibilidad a agonistas y

antagonistas e incremento de la velocidad de desensibilización respecto a los receptores con la subunidad intacta. Más aún, algunos residuos hidrofóbicos (leucinas), altamente conservados en ese bucle intracelular en las subunidades α_4 y β_2 , han sido identificados como puntos determinantes para la salida del nAChR desde el RE hacia la membrana celular (Ren y col., 2005). De igual manera, la fosforilación de residuos específicos de ese dominio es un mecanismo importante por el que la célula regula la eficiencia del ensamblaje, la expresión y la función de los nAChRs (Guo y Wecker, 2002). El largo bucle entre M3 y M4 también contiene secuencias importantes para la distribución de receptores en la superficie celular. Así, por ejemplo, en ganglio ciliar de pollo, se ha observado que este bucle intracelular de la subunidad nicotínica α_3 contiene secuencias que hacen que esta subunidad se localice en la región sináptica. Por el contrario, determinadas secuencias de este mismo bucle de la subunidad α_7 condicionan que esta subunidad se localice perisinápticamente (Temburni y col., 2000).

Otros mecanismos de control que limitan el tráfico de AChRs a la membrana celular, a la vez que garantizan que sólo los nAChRs correctamente ensamblados sean transportados a la misma, son el propio RE y el sistema celular de degradación proteica. De hecho, el 80% de las subunidades nicotínicas sintetizadas parecen ensamblarse incorrectamente y nunca abandonan el RE, donde terminan por ser degradadas en el proteasoma tras sufrir un proceso de ubiquitinación (Fenster y col., 1999; Wanamaker y col., 2003; Pakkanen y col., 2006; Colombo y col., 2013). Pero el RE actúa también como factor limitante del número de receptores expresados en membrana por su capacidad para retener subunidades, posiblemente bien ensambladas formando receptores viables, pero que terminan finalmente siendo degradadas sin llegar a la periferia celular. Así se ha demostrado que si se reduce la degradación de las subunidades nicotínicas en el RE, mediante el bloqueo del proteasoma, aumenta la expresión de nAChRs en la membrana celular (Christianson y Green, 2004; Colombo y col., 2013). El estudio de Corringer y colaboradores (2006), realizado en células HEK293 transfectadas con las subunidades α_4 y β_2 , revela que el nAChR formado se distribuye por toda la célula, con un 15% de localización en membrana plasmática y las restantes subunidades retenidas en el RE y/o Golgi. Este patrón de expresión es típico

de nAChR heteroméricos, tanto nativos como expresados heterológamente en líneas celulares.

Una vez producido el ensamblaje de subunidades nicotínicas para formar la estructura pentamérica del receptor en el RE, una fracción de aquellos receptores ensamblados correctamente es reclutada en los sitios de salida del RE, atraviesa las vesículas COPII y llega al complejo de Golgi y, finalmente a la membrana plasmática mediante un sistema de transporte vesicular. Una vez en membrana, los nAChRs sufren un proceso de internalización en el compartimiento endosomal y posteriormente son transportados al compartimiento lisosomal, donde pueden ser degradados o devueltos a la superficie celular. Aunque estos procesos no están bien estudiados ni completamente aclarados, si se conoce la existencia de determinadas proteínas reguladoras de estos procesos, algunas de las cuales aparecen reflejadas en la Tabla 1 (Colombo y col., 2013).

3 EL RECEPTOR NICOTÍNICO NEURONAL DEL SUBTIPO α_7 .

3.1. Distribución, función e implicaciones fisiopatológicas.

Los receptores nicotínicos neuronales para la ACh del subtipo α_7 (α_7 nAChR) están ampliamente distribuidos en sistema nervioso periférico y central (Chen y Patrick, 1997; Drisdell y Green, 2000), donde se ha descrito su localización presináptica o postsináptica e, incluso, extrasináptica (Fabian-Fine y col., 2001). Este subtipo de receptor se distribuye ampliamente en diferentes regiones cerebrales, aunque su expresión es especialmente elevada en la zona CA1 del hipocampo, y en la corteza entorrinal (Court y col., 2000). En corteza motora, el receptor se localiza en las neuronas piramidales de las capas II, III, V y VI (Wevers y col., 1994), mientras que en los ganglios basales, su expresión es elevada en la sustancia negra, intermedia en el caudado y putamen y baja en el estriado (Court y col., 2000). En cerebelo, la expresión del α_7 nAChR es elevada en células de Purkinje, con mayor densidad en la capa granulosa (Court y col., 2000). Asimismo, se han encontrado niveles elevados de ARNm de la subunidad α_7 en el núcleo reticular y en el cuerpo geniculado lateral y medial, en contraste con los bajos niveles encontrados en tálamo (Court y col., 2000; Spurden y col., 1997).

En neuronas, el α_7 nAChR homomérico presináptico modula la liberación de neurotransmisores en las terminales presinápticas e induce impulsos excitatorios en neuronas postsinápticas (Adler y col., 1998; Anderson y Blobel, 1981). Entre los neurotransmisores cuya liberación es regulada por el α_7 nAChR se encuentran el glutamato (Gray y col., 1996; Sharma y Vijayaraghavan, 2008), el GABA (Li y col., 2001; Zhang y Berg, 2007), la dopamina (Dickinson y col., 2008; Grady y col., 2007) y la serotonina. Adicionalmente, la señalización a través de los α_7 nAChRs expresados en SNC ha sido asociada con fenómenos de plasticidad neuronal y supervivencia celular (Azam y col., 2003; Blount y Merlie, 1989), mientras que una deficitaria actividad o una reducida expresión en membrana de este subtipo de receptor ha sido implicada en la etiopatogenia de enfermedades como el Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia y depresión (Blount y col., 1990; Boulter y col., 1986; Shen y col., 2009; Vallés y col., 2009).

La presencia de α_7 nAChRs también ha sido demostrada en otros tipos celulares de naturaleza no neuronal, como son las células endoteliales vasculares o cerebrales, las células del epitelio bronquial, los queratinocitos, astrocitos, sinoviocitos, timocitos, linfocitos, células de médula ósea, monocitos, macrófagos y microglía (ver la revisión de Arias y col., *Int J Biochem Cell Biol* 41, 1441-1451, 2009). El α_7 nAChR expresado en células no neuronales ejerce funciones diferentes a las anteriormente descritas en neuronas; estas otras funciones incluyen la regulación y modulación de procesos relacionados con vías de señalización, migración, neo-angiogénesis, proliferación y muerte celular. También es muy interesante la reciente observación de que el α_7 nAChR expresado en macrófagos es un elemento clave para el control de la inflamación por el nervio vago, como se describirá en detalle más adelante (Borovikova y col., 2000).

En relación con el papel fisiopatológico del α_7 nAChR en ciertas enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas, se ha identificado un plegamiento aberrante de subunidades α_7 que produciría una alteración del tráfico del receptor a la membrana, lo cual podría contribuir al desarrollo de las anteriores enfermedades (Valles y Barrantes, 2012). De hecho, se ha encontrado una disminución del número de α_7 nAChRs en cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Oddo y LaFerla, 2006). Por otra parte, la relación entre los α_7 nAChRs y la esquizofrenia está fuertemente sustentada por numerosos trabajos que demuestran la disminución de sitios de fijación de α -Bgtx en el cerebro de sujetos esquizofrénicos, especialmente en hipocampo (Freedman y col., 1995), en el córtex cingulado, el núcleo reticular del tálamo, así como en la corteza prefrontal (Court y col., 1999; Guan y col., 1999; Marutle y col., 2001). También se ha identificado un polimorfismo de una sola base (SNP) en la región promotora del gen (*CHRNA7*) que codifica para la subunidad α_7 ; dicho polimorfismo ha sido asociado con la esquizofrenia ya que conduce a una disminución de la transcripción de la subunidad (Leonard y col., 2002). Todos estos resultados podrían explicar la mayor incidencia del tabaquismo en la población esquizofrénica frente a la población normal (80% vs. 20%), así como el hecho de que la nicotina del cigarrillo es capaz de aliviar algunos de los síntomas del paciente esquizofrénico, siendo el hecho de fumar una forma de “automedicarse” por parte de estos pacientes.

Adicionalmente, existen numerosos trabajos científicos realizados en pacientes esquizofrénicos que demuestran una asociación entre los α_7 nAChRs y el déficit de “filtrado sensorial de la onda p50”, un endofenotipo asociado a esta patología psiquiátrica (Adler y col., 1998; Freedman y col., 2001). En condiciones normales, el filtrado sensorial viene definido como la habilidad del sujeto para discriminar entre los estímulos relevantes y los no relevantes en relación con la ejecución de tareas. La deficiencia para discriminar entre ambos tipos de estímulos en los sujetos esquizofrénicos provoca una sobrecarga sensorial que, a su vez, produce una fragmentación cognitiva que determina el deterioro de atención y concentración característico de estos pacientes. La onda p50 es un potencial evocado por un estímulo auditivo que se origina en el lóbulo temporal y en hipocampo; este potencial posee polaridad positiva y recibe su denominación en base al tiempo que tarda en aparecer (50 ms) en el registro electroencefalográfico después de la aplicación del estímulo. El ensayo que se realiza para su valoración consiste en la aplicación de dos estímulos auditivos sucesivos (E1 y E2) y la medición de las dos ondas p50 generadas. Mientras que en sujetos normales se produce una reducción de la amplitud de la onda inducida por el segundo estímulo, en el sujeto esquizofrénico no se produce tal reducción debido a la deficiencia de filtrado sensorial. El déficit de “filtrado sensorial p50” es normalizado en esquizofrénicos y familiares por el consumo de nicotina (Leonard y col., 1998), mientras que los antagonistas del α_7 nAChR agravan dicho déficit (Simosky y col., 2003). El mecanismo por el que estos receptores han sido implicados en este déficit característico de la esquizofrenia es el siguiente. La aplicación del primer estímulo (E1) activa nAChRs (α_7 , principalmente) de las interneuronas que, a su vez, liberan GABA que interacciona con receptores presinápticos GABA_B; como resultado de esta activación presináptica se reduce la liberación de glutamato, por lo que muchas de las neuronas de la región CA3 del hipocampo no serían excitadas por el segundo estímulo (E2). Una disminución en la expresión de α_7 nAChR, como ocurre en los pacientes esquizofrénicos, se traduciría en una menor liberación de GABA y, por consiguiente, en una menor capacidad para reducir la liberación de glutamato.

3.2. Características específicas del α_7 nAChR: permeabilidad iónica y mecanismos de señalización intracelular.

El α_7 nAChR se distingue del resto de los subtipos de nAChRs en que posee una alta afinidad para unir α -Bgtx, muestra una cinética de desensibilización rápida y presenta una elevada permeabilidad al paso de iones Ca^{2+} a través del ionóforo asociado al receptor; dicha permeabilidad es muy similar a la de los receptores de NMDA para glutamato (Seguela y col., 1993). De hecho, muchos de los efectos fisiológicos producidos por la estimulación del α_7 nAChR en neuronas, y que se acaban de describir en el apartado anterior, son el resultado de la activación de vías de señalización dependientes de la entrada del ión Ca^{2+} a la célula. Esta entrada de Ca^{2+} se produce a través del ionóforo nicotínico y es adicionalmente amplificada por tres mecanismos: 1) la entrada concomitante de Na^+ por el ionóforo, lo cual produce despolarización celular y la consiguiente apertura de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes (CCVD); 2) la liberación de calcio desde depósitos intracelulares del RE a través de receptores de IP_3 (IP_3Rs) (Sharma y Vijayaraghavan, 2001); y 3) la liberación de Ca^{2+} a través de receptores de rianodina (RyRs) del RE por un mecanismo conocido como CICR (liberación de calcio inducida por calcio; del inglés, *calcium-induced calcium release*). Para que se produzca la comunicación funcional entre el α_7 nAChR y los RyRs, dado que estos últimos receptores tienen baja afinidad por el Ca^{2+} , es necesario un acoplamiento físico entre ambos tipos de receptores (Sharma y Vijayaraghavan, 2001).

A nivel neuronal, el incremento de la concentración de Ca^{2+} libre intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediado por el α_7 nAChR puede activar una amplia gama de señales intracelulares responsables de los múltiples efectos producidos por este subtipo de receptor a corto y largo plazo (Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004) (Fig. 8). Entre estos efectos merecen la pena destacar aquellos que afectan a la liberación de neurotransmisores, a la plasticidad sináptica, a procesos vitales o letales los cuales pueden tener importantes implicaciones en los procesos de cognición y memoria implicados en el desarrollo y neuroprotección. Dependiendo de la vía de señalización activada y del tipo neuronal donde se exprese el receptor, así será la respuesta final obtenida. De esta manera, el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ puede activar la adenilatociclasa (AC) y, consiguientemente, a la proteína quinasa A (PKA), la Ca^{2+} /calmodulina

proteína quinasa II (CaMKII) (Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004), la proteína quinasa C (PKC) (Albuquerque y col., 2009), o la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). A su vez, estas quinasas pueden fosforilar dianas moleculares situadas por debajo de la cascada de señalización. Es el caso de la proteína quinasa ERK, cuya activación puede ser producida por la CaMK en células PC12 (Nakayama y col., 2001), o por la PKA en células SH-SY5Y (Dajas-Bailador y col., 2002). En ambos casos, independientemente de la vía de activación, la fosforilación de ERK conduce a la activación del factor de transcripción CREB, el cual se une a secuencias de ADN llamadas “elementos de respuesta a AMPc” y activa la transcripción de diversos genes, entre los que se encuentran el de la enzima tirosina hidroxilasa (TH), clave en la ruta biosintética de catecolaminas, así como el del factor de crecimiento nervioso (NGF).

Por otra parte, se ha descrito que la nicotina, a través de la activación del α_7 nAChR, puede comportarse como agente citotóxico para neuronas en desarrollo y células progenitoras (Mechawar y col., 2004), o como neuroprotector en neuronas diferenciadas (Dajas-Bailador y col., 2000). Ambos efectos están mediados por el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ producido por la activación del receptor; según sea la capacidad amortiguadora del $[Ca^{2+}]_i$ que posea la célula en cuestión, así será el efecto final producido. De este modo, en células inmaduras, la elevación de $[Ca^{2+}]_i$ es citotóxica y activaría procesos pro-apoptóticos. Mientras que la neuroprotección celular mediada por el α_7 nAChR frente a la excitotoxicidad por glutamato estaría condicionada por la activación de la tirosina quinasa Janus 2 (JAK2) que, a través de PI3K, fosforila Akt promoviendo mecanismos de supervivencia celular, entre los que estarían las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-x (Shaw y col., 2002; Shimohama, 2009; Vallés y Barrantes, 2012). De hecho, este último mecanismo ha sido implicado en el efecto neuroprotector de nicotina frente a la acción tóxica de la proteína β -amiloide en células PC12 (Shaw y col., 2003).

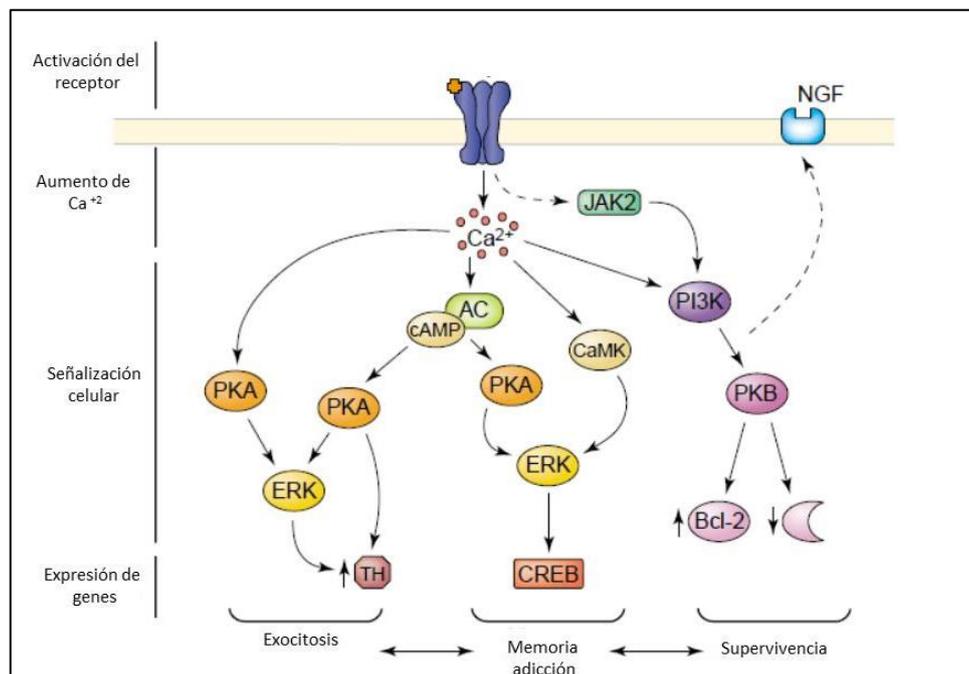


Figura 8.-Moléculas y cascadas de señalización claves implicadas en la regulación de diversas funciones neuronales mediadas por el α_7 nAChR (Figura modificada tomada de Dajas-Bailador y Wonnacott., *Trends Pharmacol. Sci.*, 2004).

3.3. Estructura pentamérica del α_7 nAChR.

La idea original de que el α_7 nAChR es homomérico tiene una importante base desde el punto de vista evolutivo, ya que la subunidad α_7 fue la primera que surgió de esta familia de receptores, antes incluso del desarrollo del cerebro (Fig. 9A). Aunque actualmente existen numerosas datos experimentales derivados de estudios de expresión heteróloga que indican que las subunidades α_7 se ensamblan entre sí formando receptores homoméricos funcionales (Chen y Patrick, 1997; Drisdell y Green, 2000), no puede descartarse que esta subunidad pueda también combinarse con otras subunidades nicotínicas, conocidas o no, dando lugar a nAChR heteroméricos. De hecho, se ha descrito la formación de receptores heteroméricos $\alpha_7\beta_2$ funcionales cuando ambas subunidades son coexpresadas en ovocitos de *Xenopus* (Khiroug y col., 2002). Por otra parte, el hecho de que α_7 y β_2 presenten un alto nivel de coexpresión en SNC ha llevado a algunos investigadores a sugerir que ambas subunidades podrían conformar receptores heteropentaméricos *in vivo* (Azam y col., 2003).

Es posible que la capacidad de asociación de la subunidad α_7 con otras subunidades nicotínicas dependa del tipo celular donde se expresa el receptor, así como de la proporción relativa de α_7 respecto a la posible subunidad con la que se pudiera combinar (Yu y Role, 1998). De hecho, se han encontrado diferencias farmacológicas y biofísicas en los nAChRs nativos que contienen subunidades α_7 según el tipo celular donde se exprese el receptor. Así, los α_7 nAChRs expresados en hipocampo de rata muestran una rápida desensibilización, a la vez que son bloqueados irreversiblemente por α Bgtx. Este comportamiento biofísico y farmacológico es el habitual de los receptores nativos que contienen la subunidad α_7 identificados hasta ahora en la mayoría de las células estudiadas. No obstante, existen algunas excepciones. Así, el α_7 nAChR expresado en neuronas de los ganglios del plexo cardiaco muestra una lenta desensibilización y no es susceptible al bloqueo por la toxina (Cuevas y Berg, 1998; Cuevas y col., 2000). También, los receptores α_7 identificados en músculo denervado de ratón presentan una lenta desensibilización y no son bloqueados por metillicaconitina, MLA, un antagonista selectivo de este subtipo de receptor (Tsuneki y col., 2003).

4 EL GEN *CHRNA7* QUE CODIFICA PARA LA SUBUNIDAD NICOTÍNICA α_7 .

4.1. Localización cromosómica y región codificadora del gen *CHRNA7* humano.

La subunidad nicotínica α_7 es una proteína de 503 aminoácidos codificada por el gen *CHRNA7*, el cual se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 15 (15q13-q14). Este gen, con un tamaño aproximado de 75 kb, está constituido por 10 exones que codifican para los diferentes dominios estructurales de la subunidad α_7 (Fig. 9). Así, los exones 1 a 6 completos, y una parte del exón 7, codifican para el dominio N-terminal extracelular de la subunidad; en este dominio se localiza el sitio de unión al ligando (exones 2-6) y la región del péptido señal (exón 1) (de Jonge y Ulloa, 2007). El primer dominio transmembrana (M1) comienza en el exón 7, mientras que el resto de los segmentos transmembrana (M2-M4) están codificados por los exones 8-10 (Severance y col., 2004). El largo dominio citoplasmático (parte de los exones 9 y 10) es crucial para la expresión del receptor funcional (Mukherjee y col., 2009).

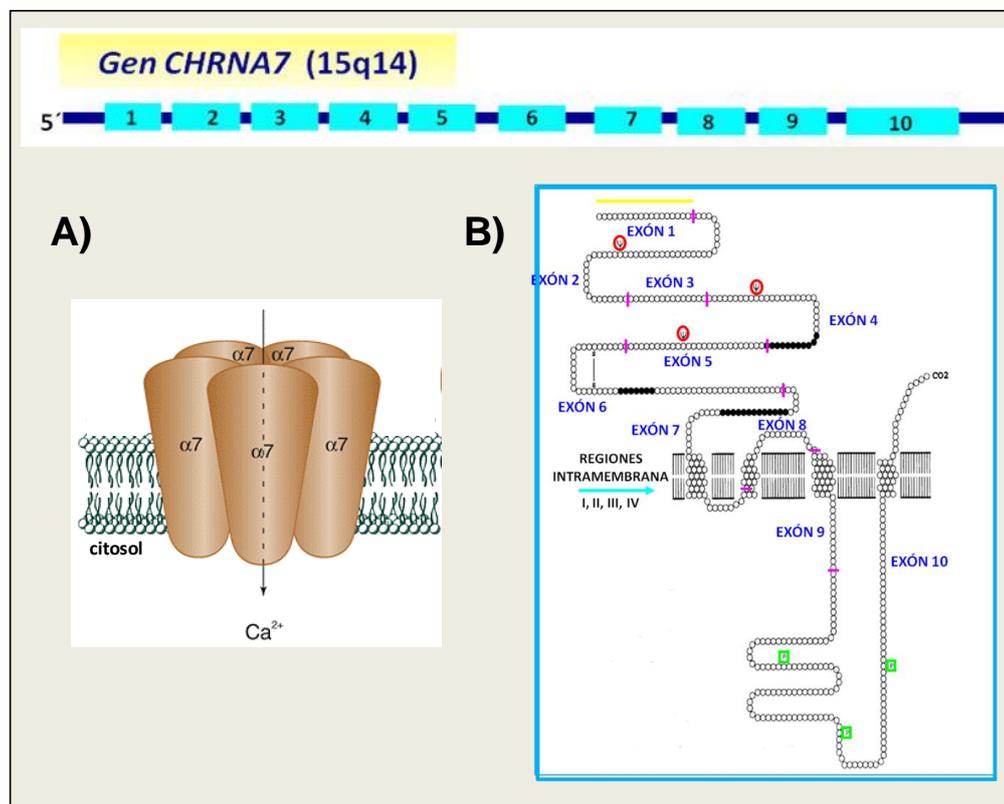


Figura 9.-Exones del gen *CHRNA7* que codifica para la subunidad α_7 del nAChR. A) Estructura del receptor homomérico formado por el ensamblaje de las 5 subunidades α_7 . B) Dominios estructurales de la subunidad α_7 y exones que los codifican; en amarillo aparece la secuencia correspondiente al péptido señal.

El cromosoma 15 es uno de los cromosomas autosómicos que más duplicaciones segmentales presenta; esto es, regiones de más de 1 kb con identidad con otras regiones del genoma mayor del 90%. Así, el 8,8% de la eucromatina del cromosoma 15 está compuesta por estas duplicaciones segmentales (Zody y col., 2006). Dentro de este cromosoma, la región cromosómica 15q11-14 es una de las que concentra más duplicaciones, además de tener gran interés fisiopatológico. Así, a través de estudios de ligamiento génico múltiple, se ha podido constatar que dicha región contribuye a la etiología de diversas patologías (Figura 10), como la esquizofrenia (Leonard y Freedman, 2006; Iwata y col., 2007), el trastorno bipolar (Hong y col., 2004; Flomen y col., 2006) y algunos tipos de epilepsia, como la epilepsia mioclónica juvenil (Taske y col., 2002). Además, esta región cromosómica ha sido también implicada en la agenesia del cuerpo calloso con neuropatía periférica (Casaubon y col., 1996), así como en los síndromes de Prader-Willi y de Angelman (Christian y col., 1999; Boer y col., 2002). En esta región, a una distancia de 1.6 Mb del gen *CHRNA7*, hacia la región centromérica del cromosoma, se ha identificado un nuevo gen (*CHRFAM7A*) resultante de la duplicación parcial del gen *CHRNA7* que codifica para la subunidad nicotínica α_7 (Gault y col., 1998; Riley y col., 2002).

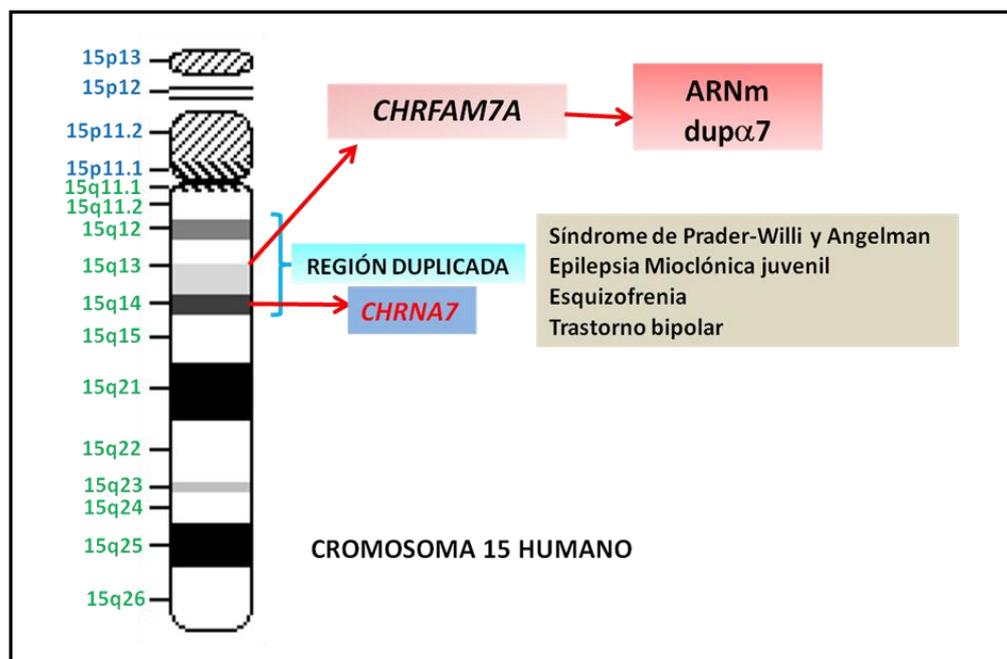


Figura 10.-Esquema de la localización del gen *CHRNA7* y de su duplicado parcial *CHRFAM7A* en el cromosoma 15 humano. Ambos genes se localizan en una región cromosómica con un alto índice de duplicaciones génicas; esta región ha sido implicada en la etiopatogenia de diversas enfermedades.

4.2. El nuevo gen *CHRFAM7A*, un duplicado parcial del gen *CHRNA7*.

Las duplicaciones génicas constituyen un fenómeno habitual dentro de los genomas animales y vegetales. De hecho, estas duplicaciones, junto con el procesamiento alternativo del ARNm inmaduro, constituyen procesos imprescindibles para la diversificación génica (Kopelman y col., 2005; Su y col., 2006). Aproximadamente, el 6% de las diferencias encontradas entre el genoma de chimpancé y el humano son el resultado de procesos de duplicación (Conrad y Antonarakis, 2007). Las duplicaciones no siempre son completas; a veces el fragmento de ADN duplicado solo contiene parte del gen ancestral (duplicaciones parciales), mientras que otras veces puede contener trozos de varios genes (duplicaciones quiméricas). En relación con las subunidades de los nAChRs, se ha demostrado que las mayores reorganizaciones durante la evolución han ocurrido como consecuencia de procesos de duplicación génica y mutaciones; estos procesos han originado modificaciones en el contenido de exones así como en los mecanismos de regulación de la expresión de estas subunidades (Le Novère y Changeux, 1995).

Gault y colaboradores (1998) identificaron un nuevo gen en el cromosoma 15 humano resultante de la duplicación parcial del gen *CHRNA7* que codifica la subunidad nicotínica α_7 . El nuevo gen presentaba una elevada homología (> 99%) con la región comprendida entre el exón 5 y la región 3'-UTR del gen *CHRNA7*, pero carecía de los exones 1-4 del gen original. En sustitución de los mismos, el nuevo gen incorporaba los exones D, C, B, A. De estos cuatro exones atípicos, los exones C-A, correspondían a un segundo gen, el gen *FAM7A*, y eran el resultado de la duplicación parcial de una serina-treonina proteína quinasa similar a ULK4 (unc-51-like kinase 4 de *C. elegans*) presente también en el cromosoma 3p21. De hecho, estos exones también se encuentran repetidos en varios loci de la región cromosómica 15q13-14. Por su parte, el exón D es de origen desconocido y aparece repetido en otros cinco loci del cromosoma 15, pero no en el cromosoma 3 (Sinkus y col., 2009). Por tanto, el nuevo gen resultante de la duplicación parcial de *CHRNA7* es realmente un gen híbrido que fue denominado *CHRFAM7A*, y el producto resultante de su transcripción, dup α_7 (Fig. 11).

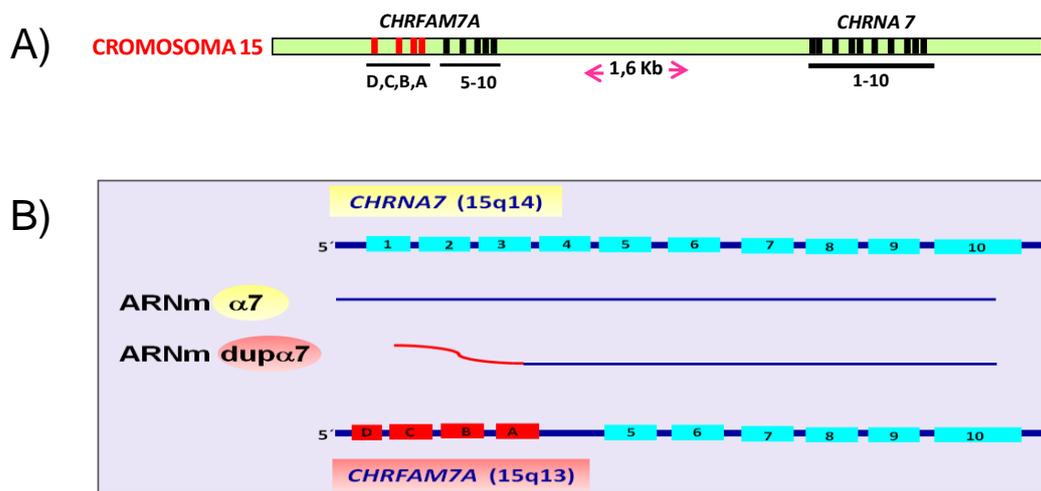


Figura 11.- Los genes *CHRNA7* y *CHRFAM7A* humanos. A) Localización de ambos en el cromosoma 15, con los exones de cada uno de ellos. B) Homologías y diferencias entre los exones de ambos genes y sus correspondientes transcritos (α_7 y $\text{dup}\alpha_7$).

El gen híbrido *CHRFAM7A*, localizado en el brazo largo del cromosoma 15 (15q13-q14), es polimórfico; unos pocos individuos poseen dos alelos carentes de este gen, frente a la mayor parte de la población (> 95%) que posee una o dos copias del mismo. Se han identificado algunos individuos portadores del gen con un polimorfismo consistente en la delección de 2 pb (ΔGT) en el exón 6; esta delección daría lugar a una proteína truncada (Broadbent y col., 2006; Cammarota y col., 2002). La adquisición de este gen duplicado parece ser un fenómeno evolutivo bastante reciente ya que *CHRFAM7A* solo aparece en humanos y no en otros primates superiores (Locke y col., 2003).

Dado que un 82% de la secuencia nucleotídica del ARNm de $\text{dup}\alpha_7$ es idéntica a la de α_7 , ha sido necesario realizar PCRs con cebadores específicos a la hora de poder diferenciar la distribución tisular y la expresión celular de estos dos transcritos. De esta manera, se ha podido constatar que el ARNm de $\text{dup}\alpha_7$ se expresa en médula espinal (Villiger y col., 2002) y en diferentes regiones cerebrales, como hipocampo, corteza, cuerpo calloso, tálamo, núcleos caudado y putamen del estriado y cerebelo (Villiger y col., 2002; Severance y Yolken, 2008). También se ha demostrado la presencia de este transcrito en células del sistema inmune, en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) (Villiger y col., 2002; Severance y col., 2009), en linfocitos de sangre periférica (Perl y col., 2006), en la línea celular HL-60 (Villiger y col., 2002) y en sinoviocitos (van Maanen y col., 2009). De hecho, en células HL60 solo se ha logrado

detectar el ARNm de $\text{dup}\alpha_7$ pero no el de α_7 (Villiger y col., 2002; Perl y col., 2006; Severance y col., 2009).

4.3. Los transcritos α_7 y $\text{dup}\alpha_7$ humanos: similitudes y diferencias entre las secuencias peptídicas.

Durante muchos años, no se dispuso de ningún dato experimental que probara que el transcrito $\text{dup}\alpha_7$ era capaz de traducirse a proteína y, si así lo hacía, cuál era su papel funcional. Sin embargo, a partir de la secuencia nucleotídica del $\text{dup}\alpha_7$, si se pudo deducir la secuencia peptídica de la proteína. Tras la comparación de la misma con la de la subunidad α_7 (Fig. 12), lo primero que llama la atención del $\text{dup}\alpha_7$ es la pérdida de una parte sustancial del largo dominio NH_2 -terminal extracelular, característico de todas las subunidades nicotínicas identificadas hasta la fecha. Sin embargo, dado que el transcrito de $\text{dup}\alpha_7$ conserva los exones 5-10 de la subunidad α_7 , la proteína resultante conservaría las cuatro regiones transmembrana (M1-M4), el bucle intracelular entre M3 y M4 y el dominio C-terminal extracelular.

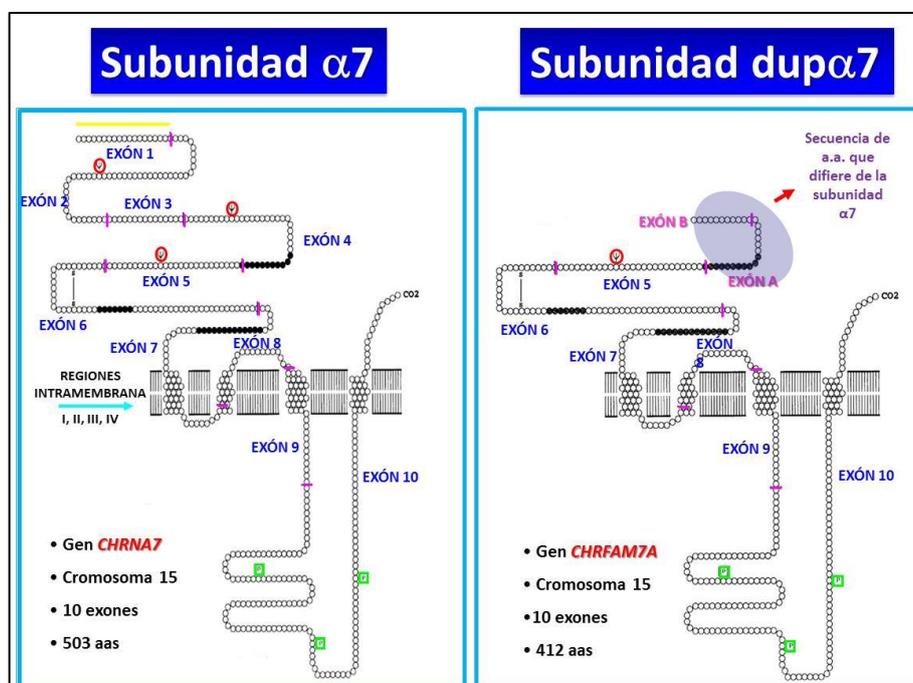


Figura 12.- Esquema de la estructura peptídica deducida a partir del transcrito de $\text{dup}\alpha_7$. El esquema ha sido tomado de (Gault y col., 1998), con algunas modificaciones. A la izquierda, con fines comparativos, se representa la secuencia peptídica de la subunidad α_7 .

En este punto, cabe preguntarse cuál podría ser la distribución celular de la subunidad dup α_7 y si podría o no formar parte de un receptor funcional. Para ello, basándonos en la secuencia peptídica deducida de dup α_7 y en su comparación con la subunidad α_7 , se puede predecir que la subunidad dup α_7 carecería de la región péptido señal, la cual se ha mostrado clave para el correcto ensamblaje y expresión de otras subunidades nicotínicas, como por ejemplo la subunidad α_1 nicotínica muscular (Gault y col., 1998). De hecho, el exón-1 de la subunidad α_1 codifica para la secuencia señal que permite la entrada del péptido al RE. Por ello, es previsible que dup α_7 , en caso de que se tradujera *in vivo*, diera lugar a una subunidad con una localización mayoritariamente intracelular (Gault y col., 1998). Por otra parte, la “hipotética” subunidad dup α_7 también carecería de los sitios de unión de ACh y α -Bgtx, lo que haría difícil que pudiera tener un papel funcional similar al de otras subunidades nicotínicas α . No obstante, puesto que dup α_7 aún conserva completos los cuatro dominios transmembrana (M3-M4), el bucle intracelular entre M3 y M4, así como la región C-terminal, no es descartable que pudiera tener alguna otra función, muy probablemente reguladora (Gault y col., 2003; van Maanen y col., 2009, Araud y col., 2011; Benfante y col., 2011).

4.4. Implicaciones fisiopatológicas del gen *CHRFAM7A* y de su transcrito dup α_7 .

Existen diversos motivos para que en los últimos años, el estudio del gen *CHRFAM7A* y de su transcrito dup α_7 haya captado gran atención por parte de la comunidad científica. Entre las razones que motivan este interés se incluyen: 1) la localización del gen en una región del cromosoma 15 tan importante para el desarrollo cerebral y que contiene varios genes implicados en enfermedades neurológicas y psiquiátricas; 2) el interés que despierta el estudio de una nueva duplicación aparecida tan recientemente en el proceso evolutivo; y 3) el gran desconocimiento que existe hoy día sobre este nuevo gen y su transcrito.

La mayoría de los trabajos relacionados con dup α_7 y su posible implicación fisiopatológica en ciertas enfermedades psiquiátricas se han centrado en el estudio del gen *CHRFAM7A*, bien evaluando marcadores de su secuencia nucleotídica, o analizando el nivel de expresión del correspondiente ARNm. Los resultados de estos

trabajos han sido poco concluyentes. Así, aunque se ha podido establecer una clara asociación entre el gen *CHRNA7*, la esquizofrenia y el déficit de “filtrado sensorial de la onda p50”, existen resultados contradictorios a la hora de demostrar una asociación similar entre este último endofenotipo de la esquizofrenia y el gen *CHRFAM7A*. En este sentido, se ha descrito una asociación entre el polimorfismo con la delección Δ GT de este último gen y dicho déficit (Raux y col., 2002), mientras que dicha asociación no ha podido ser corroborada en otro estudio posterior (Sinkus y col., 2009).

De igual manera, también se han obtenido resultados ambiguos en relación a la asociación del gen *CHRFAM7A* con la esquizofrenia. El trabajo más reciente, realizado con el mayor número de pacientes incluidos en un estudio de estas características, encuentra una asociación significativa entre el polimorfismo Δ GT del gen *CHRFAM7A* y la esquizofrenia (Sinkus y col., 2009), a pesar de que existe un estudio previo, realizado con un número pequeño de pacientes, que no consigue establecer ningún tipo de relación (Flomen y col., 2006). Resultados contradictorios se han encontrado también en relación a la asociación del gen *CHRFAM7A* y el trastorno bipolar. Así, por un lado, se ha podido constatar una débil asociación entre esta enfermedad con el polimorfismo Δ GT de $\text{dup}\alpha_7$ (Hong y col., 2004), mientras que en un estudio posterior no se aprecia dicha asociación (Flomen y col., 2006). No obstante, es interesante resaltar que se ha observado una disminución del cociente entre los transcritos $\alpha_7/\text{dup}\alpha_7$ en estudios post-mortem realizados en corteza prefrontal de pacientes diagnosticados con trastorno bipolar, frente a individuos sanos (De Luca y col., 2006). Este incremento en el nivel de expresión del ARNm de $\text{dup}\alpha_7$ frente a α_7 sugiere la existencia de variaciones en las regiones promotoras de los dos genes y/o una posible modulación de la transcripción por factores patológicos o ambientales. De hecho, se ha encontrado una disminución de los niveles del transcrito $\text{dup}\alpha_7$ en CMSP de sujetos fumadores respecto a no fumadores (Severance y col., 2009), lo que de nuevo sugiere una posible modulación de la expresión del gen *CHRFAM7A* por factores ambientales.

En relación con las enfermedades neurodegenerativas, y en la misma línea de todo lo anteriormente expuesto, se ha encontrado que el alelo 1 del gen *CHRFAM7A* (sin el polimorfismo Δ GT) tiene una mayor prevalencia en pacientes que sufren cierto

tipo de demencias, tales como la enfermedad Alzheimer, la demencia con cuerpos de Lewi (DCL) o la enfermedad de Pick (Feher y col., 2009). Los autores proponen como posible explicación que el producto génico del alelo 1 podría alterar el ensamblaje del receptor nicotínico α_7 y que el polimorfismo ΔGT , al dar lugar a un péptido truncado, evitaría dicha alteración.

En resumen, los datos de la literatura publicados hasta la fecha no permiten sacar conclusiones definitivas en relación con la implicación del gen *CHRFAM7A* en determinadas enfermedades psiquiátricas y neurológicas. Sin embargo, la aparición del gen *CHRFAM7A* en la especie humana y su ausencia en otros primates superiores sugiere que esta subunidad podría conferir ciertas ventajas evolutivas sobre el genotipo sin la duplicación (Flomen y col., 2006).

4.5. El transcrito dup α_7 es traducido a una proteína con actividad funcional.

A pesar de todos los estudios mencionados anteriormente, no existían en la literatura evidencias experimentales demostrando que el transcrito dup α_7 era traducido a proteína, y cuál es el posible papel funcional de la misma. La limitación fundamental para resolver ambas cuestiones radicaba en la falta de disponibilidad del ADNc de dup α_7 con el que poder realizar el estudio funcional. Como se ha comentado en el apartado anterior, algunos autores han propuesto de forma totalmente teórica que, en caso de que se llegara a formar la subunidad dup α_7 , ésta podría alterar el ensamblaje de los receptores homoméricos α_7 actuando como dominante negativo (Raux y col., 2002; Feher y col., 2009). Dicho efecto dominante negativo se perdería en el caso del polimorfismo ΔTG ya que, al originarse una proteína truncada, ésta no interferiría con la subunidad α_7 (Flomen y col., 2006). Otros autores, por el contrario, han sugerido que sería precisamente esa proteína truncada la que ejercería un efecto dominante negativo sobre la función normal de la subunidad α_7 (Dempster y col., 2006).

Esta carencia de información llevó a nuestro grupo a embarcarse en un proyecto de investigación desarrollado durante los últimos años y encaminado a resolver algunas de las incógnitas planteadas anteriormente. Así, por primera vez, procedimos a clonar el ADNc de dup α_7 en el vector pSP64T para expresarlo en ovocitos de *X. laevis*. De esta

manera pudimos comprobar que el ARNm de dup α_7 se traducía, tanto de forma nativa en células HL-60 como heterológamente en ovocitos (de Lucas-Cerrillo y col., 2011). Más aún, demostramos que la inyección de ARNm de dup α_7 en ovocitos no generaba receptores funcionales pero, cuando se co-inyectaba junto con el ARNm de α_7 , en una relación α_7 /dup α_7 de 2:1, 1:1, 1:5 y 1:10, producía una inhibición, concentración-dependiente, de la corriente α_7 inducida por nicotina en los ovocitos controles (inyectados sólo con α_7 ARNm) (Fig. 13). Nuestro principal hallazgo fue que la subunidad dup α_7 se comportaba como un dominante negativo de la actividad del α_7 nAChR en estudios de expresión heteróloga en ovocitos. La función atribuida a la subunidad dup α_7 fue corroborada, unos meses más tarde, por otro grupo de gran prestigio en el campo de los receptores nicotínicos (Araud y col., 2011). Que la subunidad dup α_7 podría tener un papel fisiopatológico *in vivo*, a través de su interacción con el α_7 nAChR, se deduce de los resultados obtenidos en diversos estudios, incluyendo el nuestro, en donde se demuestra que la expresión del dup α_7 , a nivel del ARNm, puede ser regulada por diversos estímulos proinflamatorios, como LPS o IL-1 β , así como por nicotina (de Lucas-Cerrillo y col., 2011; Benfante y col., 2011). En estos trabajos, realizados en distintas líneas celulares de naturaleza monocítica (Mono-Mac, U937 y THP-1), así como en macrófagos humanos diferenciados, se observó que el nivel de ARNm de dup α_7 disminuía tras la incubación de las células con los anteriores estímulos, y que esta disminución se producía a nivel transcripcional.

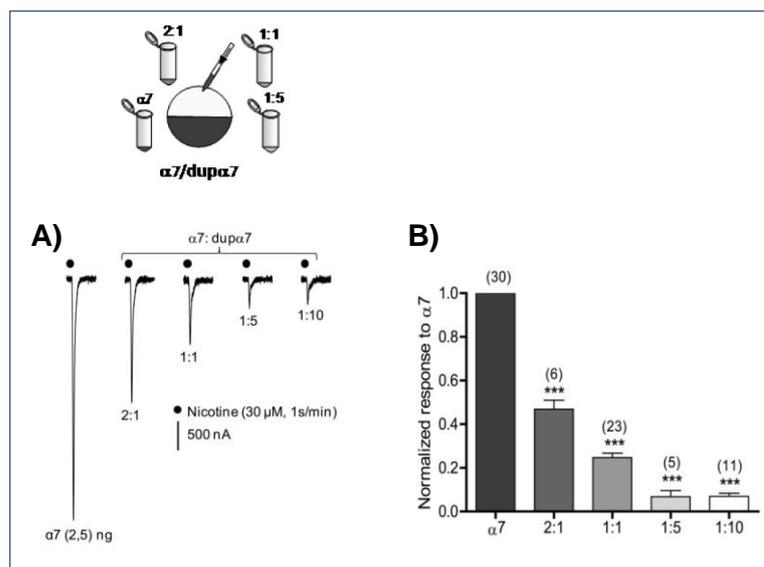


Figura 13.- Efecto dominante negativo de dup α_7 sobre las corrientes α_7 inducidas por nicotina en ovocitos inyectados con distintas combinaciones de ARNs de α_7 :dup α_7 . A) Registros originales obtenidos en 5 ovocitos típicos. B) Valores medios \pm EEM de las corrientes obtenidas en el número de ovocitos en paréntesis. (Tomado de de Lucas-Cerrillo y col., 2011).

Adicionalmente, nuestro grupo también demostró que el efecto dominante negativo de dup α_7 era debido a la reducción del número de α_7 nAChRs funcionales que alcanzaban la membrana del ovocito. Este último hallazgo puede deducirse de los datos de unión de [125 I]- α -Bgtx a la membrana de ovocitos inyectados con el ARNm de α_7 o con la combinación (1:4) de α_7 :dup α_7 ARNm (Fig. 14), así como de los resultados de microscopía confocal visualizando la fluorescencia resultante tras marcar los receptores expresados en la membrana del ovocito con el anticuerpo anti- α_7 (Mab306), o con la toxina α -Bgtx unida al fluoróforo FITC (Fig. 15).

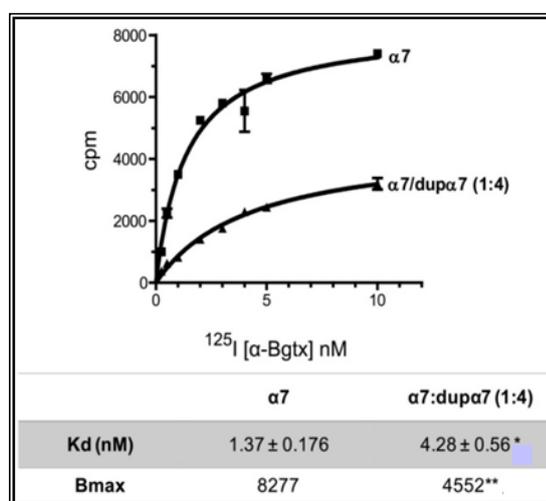


Figura 14.- La coinyección de dup α_7 reduce el número de sitios de fijación de [125 I]- α Bgtx en ovocitos intactos inyectados con α_7 ARNm (Tomado de de Lucas-Cerrillo y col., 2011).

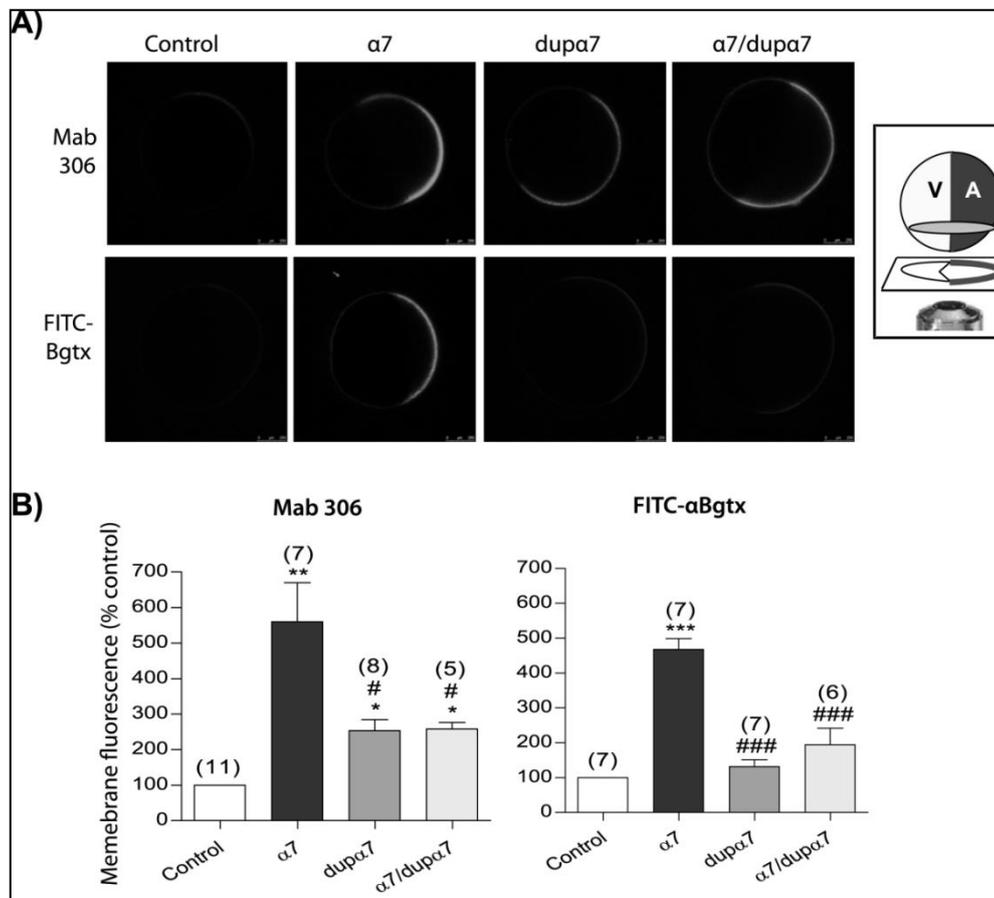


Figura 15.- Dup α_7 reduce la expresión de α_7 nAChRs funcionales en ovocitos. A) Imágenes confocales de fluorescencia en ovocitos no inyectados (controles), o inyectados con α_7 ARNm, con dup α_7 ARNm, o con la combinación (1:1) de α_7 :dup α_7 ARNm. Los 4 grupos de ovocitos fueron incubados con el anticuerpo Mab306 (que reconoce ambas proteínas) o con FITC- α Bgtx (solo reconoce α_7 nAChRs funcionales). B) Valores medios \pm EEM de fluorescencia en el número de ovocitos en paréntesis (Tomado de de Lucas-Cerrillo y col., 2011).

Desafortunadamente, los datos de los que disponemos actualmente no permiten conocer cuál es el mecanismo por el que dup α_7 reduce la expresión de α_7 nAChRs en la membrana del ovocito, máxime teniendo en cuenta que, en este tipo celular, solo se detecta la fluorescencia generada por las proteínas expresadas en membrana pero no la de las proteínas retenidas intracelularmente. Esta limitación, también observada por otros investigadores (Dempster y col., 2006), puede ser debida a las siguientes causas: 1) la incapacidad del láser para penetrar a distancias celulares de 1mm; 2) el apantallamiento de la señal fluorescente por componentes intracelulares del ovocito, como el vitelo o los pigmentos; o 3) al hecho de que la distribución intracelular del anticuerpo sea demasiado difusa para ser detectada.

5 EL α_7 nAChR DE MACRÓFAGOS Y SU RELEVANTE PAPEL EN EL CONTROL DE LA INFLAMACIÓN.

5.1. Descubrimiento de la “vía colinérgica antiinflamatoria” y su implicación fisiopatológica.

El sistema inmune innato de los vertebrados detecta señales exógenas y endógenas de peligro a través de complejos mecanismos humorales y celulares, emitiendo una serie de respuestas que son críticas para proteger al huésped de los potenciales agentes patógenos o del daño tisular. Sin embargo, la respuesta inmune innata también puede conducir a una sobreproducción de citoquinas proinflamatorias más peligrosa que el estímulo lesivo original. Para contrarrestar el exceso de respuesta inflamatoria por parte del sistema inmune, el organismo dispone de una serie de mecanismos antiinflamatorios. Entre estos mecanismos, destaca la activación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal que conduce a una respuesta antiinflamatoria muy efectiva pero relativamente lenta y no específica. Adicionalmente, en los últimos años, el grupo de Kevin Tracey ha identificado un circuito neuronal antiinflamatorio conectado directamente con el sistema inmune. Este circuito, denominado ‘reflejo inflamatorio’, ha sido extensivamente estudiado por el anterior grupo y por muchos otros reputados investigadores (Borovikova y col., 2000; Huston y col., 2006; Rosas-Ballina y col., 2008; Rosas-Ballina y col., 2011). El circuito está compuesto por fibras aferentes (sensitivas) del nervio vago que detectan señales moleculares periféricas de daño tisular o infección (interleuquina-1 (IL-1), endotoxina, etc) y señalizan a ciertos núcleos del tronco cerebral. Al ser estimulados, estos núcleos emiten una respuesta antiinflamatoria que viaja por fibras eferentes (motoras) del nervio vago, llegando al bazo y a otros tejidos, y órganos del sistema fagocítico mononuclear, donde se inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias por los macrófagos residentes (Fig. 16).

Las bases moleculares de la anterior respuesta antiinflamatoria mediada por el nervio vago eferente, denominada ‘vía colinérgica antiinflamatoria’, han ido desvelándose poco a poco gracias a numerosos estudios publicados en los últimos años, algunos de cuyos resultados han sido realmente sorprendentes e inesperados, tal como se describe a continuación (Fig. 16). La rama eferente del vago se comunica con el bazo a través del nervio esplénico que libera el neurotransmisor noradrenalina (NA). La

NA interactúa con receptores β -adrenérgicos (β -AR) expresados en células T sintetizadores de ACh, produciéndose la liberación de este transmisor, el cuál activa α_7 nAChRs expresados en macrófagos del bazo productores de citoquinas (Rosas-Ballina y col., 2011). Por tanto, el punto culminante de este mecanismo antiinflamatorio radica en la interacción final de ACh con los α_7 nAChRs de los macrófagos y otras células productoras de citoquinas, lo cual se traduce en una reducción de la producción de citoquinas proinflamatorias desde estas células inmunes (Wang y col., 2003; Wang y col., 2004).

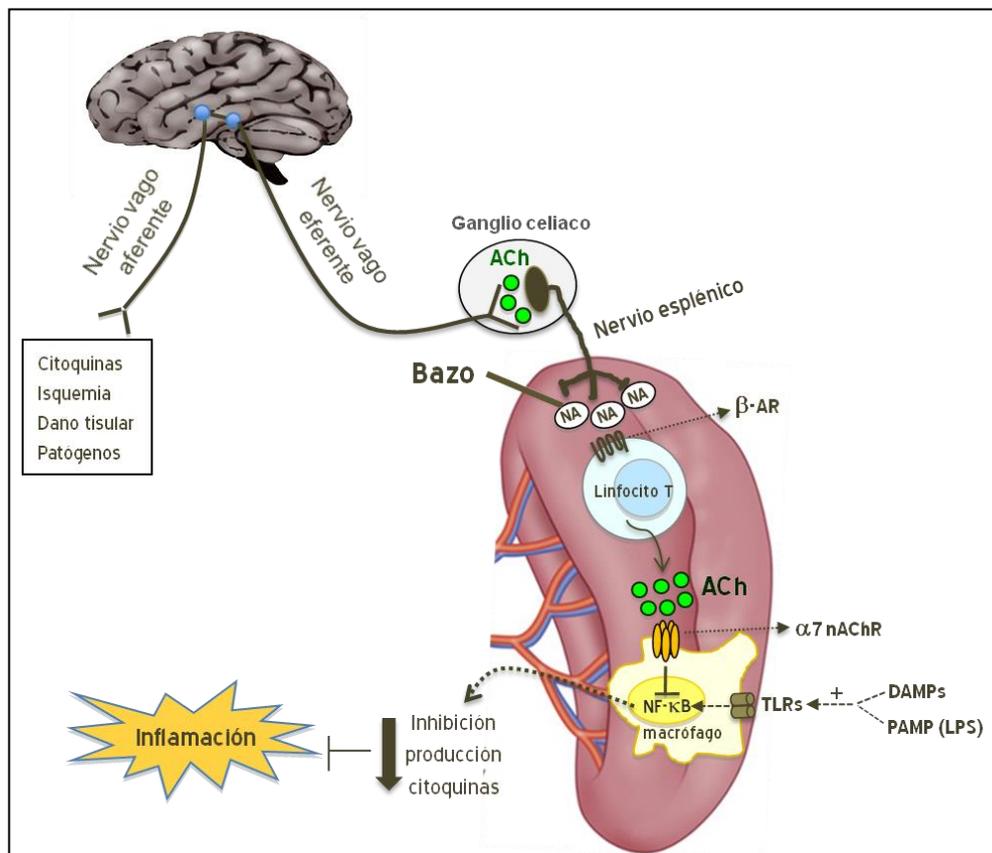


Figura 16.- Representación esquemática del circuito neuronal conocido como ‘reflejo inflamatorio’ a través del nervio vago. La rama derecha de este circuito, denominada ‘vía colinérgica antiinflamatoria’, se encarga de contrarrestar el exceso de inflamación a través de la interacción de ACh con α_7 nAChRs de macrófagos residentes en bazo y otros órganos del sistema fagocítico mononuclear. β -AR: receptores β adrenérgicos; TLRs: receptores de tipo Toll; DAMPs: patrones moleculares asociados a daño; PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos; LPS: lipopolisacárido.

El papel tan relevante desempeñado por los α_7 nAChRs de macrófagos en el contexto de la vía colinérgica antiinflamatoria fue puesto de manifiesto, por primera

vez, gracias al trabajo de Wang y colaboradores (2003), y posteriormente refrendado por otros estudios (Wang y col., 2004; Ghia y col., 2006; van Westerloo y col., 2006). En el primer estudio, los autores demostraron la presencia del α_7 nAChR en macrófagos humanos diferenciados a partir de monocitos de sangre periférica utilizando α Bgtx marcada con fluoresceína-isotiocianato (FITC) y técnicas de microscopía confocal (Fig. 17). La identidad de la subunidad nicotínica identificada en macrófagos fue confirmada posteriormente tras el clonaje y secuenciación del ADNc completo de la misma; la subunidad de macrófagos contenía los exones 1 al 10, idénticos a los encontrados en la subunidad α_7 neuronal.

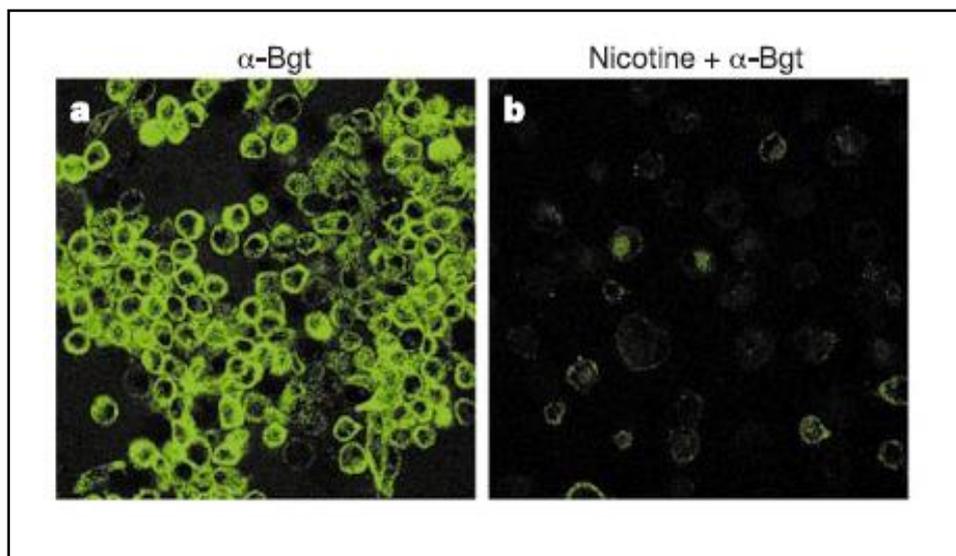


Figura 17.- Expresión de α_7 nAChRs en macrófagos humanos diferenciados a partir de monocitos de sangre periférica. a) Imagen confocal de macrófagos marcados con FITC- α Bgtx ($1,5 \mu\text{g ml}^{-1}$) mostrando la expresión de este subtipo de receptor. b) El pretratamiento de las células con una concentración elevada de nicotina ($500 \mu\text{M}$) previene el posterior marcaje de FITC- α Bgtx (Tomado de Wang y colaboradores., 2003).

La estimulación del nervio vago, o la administración de ACh, nicotina u otros agonistas nicotínicos, inhibía la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), así como de las interleuquinas IL-1 β , IL-6, IL-8 y la proteína HMGB1, del inglés high mobility group box1, en macrófagos humanos y de ratón estimulados con LPS (Wang y col., 2003; Wang y col., 2004; Ghia y col., 2006; van Westerloo y col., 2006). Que el α_7 nAChR es el responsable último de este efecto se deduce por la reducción del efecto anti-inflamatorio de estos agonistas nicotínicos en macrófagos

transfectados con el oligonucleótido antisentido frente a la subunidad α_7 , o en células incubadas con α -Bgtx, bloqueante irreversible de este subtipo de receptor. Adicionalmente, experimentos *in vivo* realizados en ratones mostraban que la estimulación del nervio vago eferente reducía significativamente los niveles plasmáticos de citoquinas inducidos por LPS, mientras que dicha estimulación no producía efecto alguno en ratones deficientes para la subunidad α_7 .

Existen muchos estudios *in vitro* demostrando los efectos inmunosupresores de los agonistas del α_7 nAChR en cultivos de macrófagos humanos y roedores estimulados con LPS. Estos resultados han podido ser también corroborados en diversos modelos de inflamación sistémica en roedores, incluyendo sepsis, pancreatitis, shock hemorrágico, lesión de isquemia-reperfusión o el íleo postoperatorio (Borovikova y col., 2000; Wang y col., 2003; Wang y col., 2004; de Jonge y col., 2005; Pavlov y col., 2006; Tracey, 2007; van der Zanden y col., 2009; Ulloa, 2013). En estos modelos experimentales, la estimulación del nervio vago eferente redujo la producción de citoquinas proinflamatorias, confiriendo protección frente al daño tisular e incrementando la supervivencia (Wang y col., 2004; Huston y col., 2007). Por el contrario, la vagotomía abdominal selectiva o la esplenectomía revertían los efectos antiinflamatorios de la estimulación del nervio vago o de los agonistas del α_7 nAChR (Borovikova y col., 2000; Huston y col., 2006). Todos estos resultados permiten atribuir un importante papel fisiopatológico a la vía colinérgica antiinflamatoria, aunque no se disponen de estudios *in vivo* realizados en humanos con enfermedades inflamatorias sistémicas.

Finalmente, no podemos dejar de mencionar la identificación de un segundo subtipo de nAChR, el heteropentámero $\alpha_4\beta_2$ expresado en la línea celular MH-S de macrófagos alveolares murinos. Este receptor también parece estar implicado en el efecto supresor de nicotina de la respuesta inflamatoria inducida por *Legionella pneumophila*, un agente causal de neumonía (Matsunaga y col., 2001). Se ha comprobado que las células MH-S expresan los transcritos de las subunidades α_4 y β_2 del nAChR, pero no de la subunidad α_7 . El tratamiento de estos macrófagos con nicotina, tras la infección con *L. Pneumophila*, aumenta significativamente la replicación de la bacteria en los macrófagos y reduce la producción de TNF- α , IL-6 y

IL-12, pero no la de IL-10. Estos efectos se bloquean completamente con la administración de *d*-tubocurarina, un antagonista no selectivo de los nAChRs, pero no con la administración del antagonista selectivo de α_7 , α -Bgtx.

Los macrófagos son células efectoras imprescindibles para el reconocimiento rápido de microorganismos invasores y moléculas derivadas de una destrucción tisular (infartos, traumatismos, quemaduras) (De Jonge y Ulloa., 2007). Estas células no solo producen citoquinas en respuesta a endotoxinas bacterianas (Wang y col., 2003), sino que también tienen como función fagocitar las bacterias y las moléculas asociadas al daño tisular (van der Zanden y col., 2009). Se ha descrito que la activación de nAChRs por nicotina, además de interferir con la producción de citoquinas, puede afectar otras funciones de los monocitos y macrófagos de diferentes especies animales (De Jonge y Ulloa, 2007). Entre las funciones afectadas se incluyen una disminución de la expresión de CD14 de la membrana (Hamano y col., 2006), o la modificación de la capacidad de respuesta fagocítica (Matsunaga y col., 2001; van der Zanden y col., 2009; Mahapatra y col., 2011).

5.2. Vías de señalización implicadas en el efecto antiinflamatorio de nicotina a través del α_7 nAChR.

El descubrimiento de que la vía colinérgica antiinflamatoria juega un papel tan relevante en el control de la inflamación (Borovikova y col., 2000; Wang y col., 2003) promovió el posterior estudio de las vías de señalización implicadas en el efecto antiinflamatorio moderado por la activación del α_7 nAChR. Los resultados obtenidos hasta la fecha ponen de manifiesto la implicación de vías de señalización que, directa o indirectamente, conducen a la inhibición de la actividad de NF- κ B y/o a la activación de STAT3, dos factores de transcripción centrales en la inmunidad innata y adaptativa (Wang y col., 2004; de Jonge y col., 2005; Arredondo y col., 2006).

El NF- κ B, identificado en 1986 por el grupo de David Baltimore, es capaz de unirse específicamente a secuencias de ADN potenciadoras (enhancers) de la transcripción de las cadenas ligeras kappa de las inmunoglobulinas (Sen y Baltimore., 1986). Desde entonces, se han identificado muchos otros genes que, en sus regiones

promotoras y potenciadoras, contienen elementos de respuesta a este factor de transcripción y que, por tanto, responden a la activación de NF- κ B. Entre estos genes se encuentran algunos claramente implicados en procesos inflamatorios, tales como los de TNF- α o IL-8 (Yoshikawa y col., 2006). En base a ello, el NF- κ B se ha perfilado en los últimos años como un elemento esencial para el control de la respuesta inflamatoria. Este factor de transcripción es un heterodímero constituido por dos proteínas p50/p65 que, en su estado inactivo, permanece retenido en el citosol formando un complejo con la proteína inhibitoria I κ B α . Sin embargo, bajo condiciones proinflamatorias, como consecuencia de la activación de receptores integrales de membrana por parte de una gran variedad de señales extracelulares, se produce la activación de la quinasa I κ B (IKK). La IKK activada, a su vez, fosforila la proteína I κ B α , lo cual produce la ubiquitinación, disociación del complejo I κ B α -NF- κ B y la degradación eventual de I κ B α por el proteasoma. De esta manera, el NF- κ B activado entra en el núcleo donde produce la transactivación de genes específicos (Fig. 18).

En el año 2004, Wang y colaboradores demostraron que nicotina prevenía la activación de NF- κ B inducida por LPS en cultivos de macrófagos humanos (Fig. 18); este efecto se traducía en una reducción de la liberación de HMGB1, una citoquina proinflamatoria producida por células inmunes activadas y que, a través de su unión con TLR-4, promueve la liberación de otras citoquinas. Se comprobó que ACh reproducía el efecto de nicotina en células de la línea celular de macrófagos de ratón RAW264.7. Tanto nicotina como ACh ejercían su efecto a través de la activación del α_7 nAChR ya que la utilización de oligonucleótidos anti-sentido para este subtipo de receptor abolía el efecto sobre NF- κ B de ambos agonistas. Más aún, utilizando ensayos de EMSA así como transfectando las células con una construcción conteniendo la región promotora de NF- κ B y el gen reportero de luciferasa, se pudo comprobar que nicotina no solo impedía la activación del factor de transcripción y su translocación al núcleo, sino que también inhibía su capacidad transactivadora génica; ambos efectos de nicotina eran mediados por el α_7 nAChR (Wang y col., 2004). El efecto de nicotina sobre NF- κ B ha podido ser también ratificado en otros tipos de macrófagos, como los macrófagos peritoneales de ratón (de Jonge y Ulloa, 2007), o la línea celular de monocitos humanos U937 (Yoshikawa y col., 2006), donde se encontró que nicotina impedía la fosforilación

de la subunidad I- κ Ba, lo cual podría explicar parte de su efecto bloqueante sobre la activación de NF- κ B.

El mecanismo molecular implicado en el efecto de nicotina sobre NF- κ B ha sido estudiado en profundidad por de Jonge y colaboradores (2005). Utilizando macrófagos peritoneales de ratón, los anteriores autores encuentran que nicotina produce la fosforilación del factor de transcripción STAT3 a través de la JAK2 (Fig. 18). Más aún, realizando experimentos de inmunoprecipitación, se demuestra que JAK2 está físicamente acoplada al α_7 nAChR. La activación de STAT3 es crucial para el efecto antiinflamatorio mediado por el α_7 nAChR, como se deduce del hecho de que los agonistas del receptor pierden su capacidad para reducir la producción de TNF- α inducida por LPS en células con el gen de STAT3 mutado en su dominio de fosforilación o en su dominio de unión a ADN. Adicionalmente, la estimulación del nervio vago inhibe la inflamación intestinal en ratones de tipo silvestre, pero no en ratones modificados genéticamente sin expresión de STAT3 en sus macrófagos.

En este punto es interesante considerar el mecanismo por el que STAT3 está implicado en el efecto antiinflamatorio mediado por el α_7 nAChR. Se ha descrito que una vez activado, STAT3 puede actuar tanto directa como indirectamente, en función del tipo de estímulo que desencadene su fosforilación. En el primer caso, el STAT fosforilado formaría dímeros que se translocan al núcleo para inducir la expresión de genes (de Jonge y col., 2005; Arredondo y col., 2006). En el segundo caso, STAT3 podría reclutar y asociarse directamente con la subunidad p65 del NF- κ B, reduciendo la capacidad de este último factor para unirse al ADN (Yoshida y col., 2004; Hoentjen y col., 2005). Los resultados obtenidos cuando se utiliza nicotina para estimular el α_7 nAChR y producir la fosforilación de STAT3 indican que este factor de transcripción regula negativamente la respuesta inflamatoria por los dos mecanismos propuestos anteriormente (Fig. 19). Así, la activación de STAT3 mediada por nicotina es capaz de inducir la expresión de SOCS3, otra proteína reguladora negativa de la respuesta inmune, y también de interactuar directamente con la subunidad p65 del NF- κ B (Yoshikawa y co., 2006).

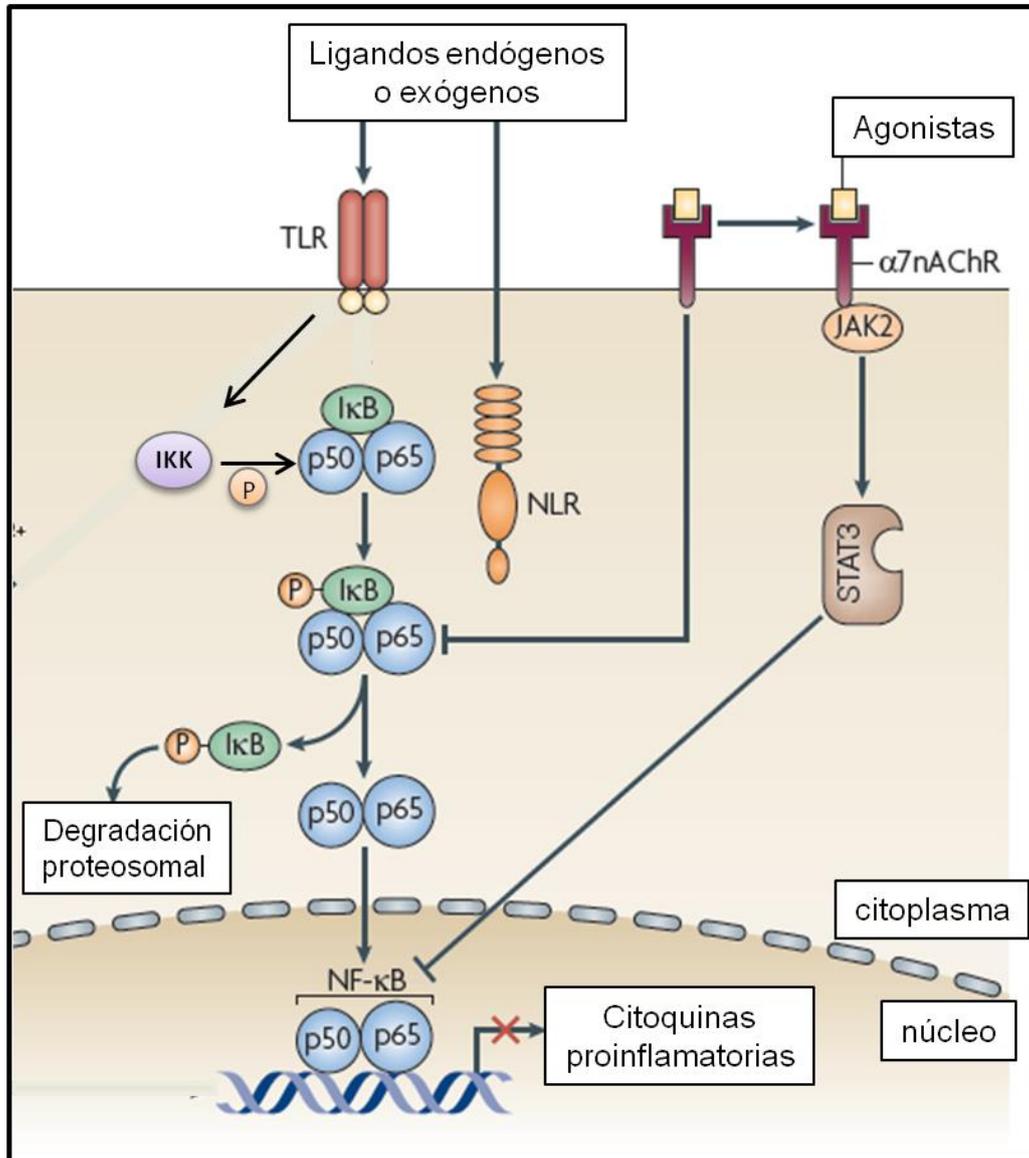


Figura 18.- Representación esquemática del mecanismo de activación de NF-κB inducida por diversos ligandos de TLRs y su interferencia por agonistas del α₇nAChR (Tomado de Tracey, 2009).

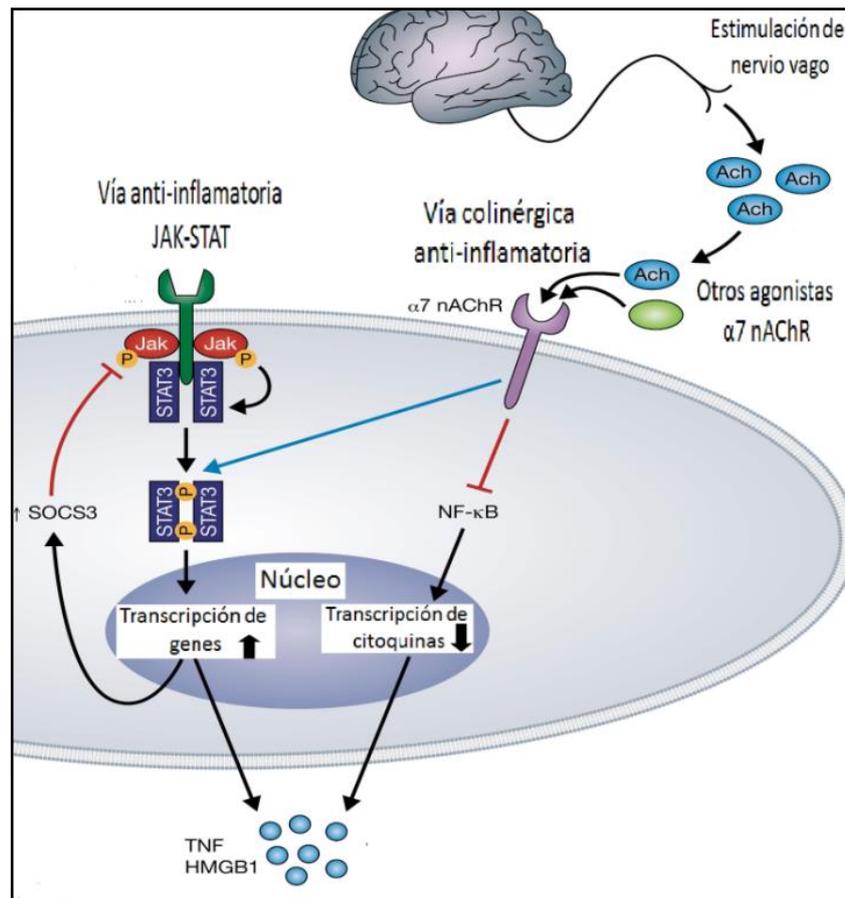


Figura 19.- Representación esquemática del mecanismo antiinflamatorio a través de la vía de señalización JAK2/STAT3 puesto en marcha tras la activación del α_7 nAChR. La activación del nervio vago conduce a la liberación de ACh que estimula el α_7 nAChR en células productoras de citoquinas. Esta estimulación previene la activación de NF- κ B a la vez que activa la fosforilación de STAT3. STAT3 activado desencadena una señal antiinflamatoria mediante por el aumento de la expresión de SOCS3, el cual inhibe la señalización de los receptores de citoquinas. El resultado final de la activación del α_7 nAChR es una reducción de la liberación de TNF- α , HMGB1 y otras citoquinas inducida por TLRs (Tomado de Tracey., 2005 con algunas modificaciones).

La PI3K ha sido también reconocida como un regulador negativo de la respuesta inflamatoria, tal como lo prueba el hecho de que su inhibición se traduce en un aumento de la activación NF- κ B y de la producción de citoquinas proinflamatorias en respuesta a LPS. Más aún, la propia estimulación con LPS induce la activación de la vía PI3K/proteína serina-treonina quinasa Akt como mecanismo de auto-regulación de la respuesta inflamatoria (Brown y col., 2011). En lo que respecta a la conexión entre PI3K y el α_7 nAChR, existen varios estudios realizados en neuronas que apoyan la idea de una asociación funcional entre ambos, lo cual explicaría el efecto neuroprotector producido por nicotina (Blanchet y col., 2006). El mecanismo implicado en esta señal de supervivencia promovida por la estimulación del α_7 nAChR se inicia con la activación de PI3K y la consiguiente fosforilación de Akt (Takada y col., 2003; Tyagui

y col., 2010). Adicionalmente, realizando estudios de inmunoprecipitación en neuronas y en monocitos humanos, se ha podido demostrar que el α_7 nAChR se encuentra físicamente asociado a PI3K (Kihara y col., 2001; Blanchet y col., 2006). Dicha asociación en monocitos humanos tiene una traducción funcional que permite explicar por qué el dimetil-4-fenil-piperazinio (DMPP), un agonista del α_7 nAChR, frena la liberación del TNF- α inducida por LPS. Más aún, el efecto de DMPP es revertido por los inhibidores de PI3K, como wortmannina y LY294002 (Blanchet y col., 2006). También, en células dendríticas murinas, ha podido probarse la conexión funcional entre el α_7 nAChR y PI3K; así, nicotina no solo fosforila PI3K/Akt sino que también incrementa el nivel de expresión del α_7 nAChR en respuesta a la activación de esa misma vía de señalización (Jin y col., 2012).

5.3. Otros posibles reguladores negativos de la respuesta inmune que podrían participar en el efecto antiinflamatorio de nicotina.

Como hemos comentado anteriormente, una desproporcionada respuesta inmune a la activación de TLRs es perjudicial para el huésped, de ahí que la existencia de mecanismos de regulación negativa de dicha respuesta sea un elemento fundamental para restablecer la homeostasis del sistema inmune. Hasta la fecha, han sido identificadas un gran número de moléculas capaces de regular negativamente la señalización de TLR. Estas moléculas incluyen SOCS-1, SOCS-3, PI3K/Akt, Myd88s, STAT3 e IRAK-M (Nakagawa y col., 2002; Kobayashi y col., 2002; Guha y col., 2002; Fukao y col., 2003; Burns y col., 2003; Hubbard y col., 2010). Tal como se ha descrito previamente, algunos de estos reguladores negativos de la señal mediada por TLRs (STAT3, PI3K, y SOCS-3) también han sido implicados en el efecto antiinflamatorio mediado por el α_7 nAChR en diversos tipos celulares, incluyendo células inmunes (Takeda y col., 1999; de Jonge y col., 2005; Blanchet y col., 2006; Li y col., 2011). Sin embargo, aún no ha sido evaluada la participación en la anterior respuesta antiinflamatoria de otros reguladores negativos, tales como el IRAK-M.

El IRAK-M, caracterizado por primera vez en humanos (Wesche y col., 1999), es un miembro de la familia IRAK. A diferencia de otros miembros activos de esta familia (IRAK-1, IRAK-4), IRAK-M carece de actividad quinasa y, por lo tanto, es

considerada una pseudoquinasa. La expresión de IRAK-M en humanos es muy restringida, ya que solo ha sido identificada en monocitos y macrófagos (Wesche y col., 1999; Rosati y col., 2002). Dicha expresión puede ser regulada no sólo por la activación de TLR, sino también en respuesta a factores solubles endógenos o exógenos (adiponectina o prostaglandina E2), así como a moléculas señalizadoras extra o intracelulares (PI3K) [véase Hubbard y Moore, 2010]. Una vez que la expresión de IRAK-M es inducida por la activación de TLR, la pseudoquinasa impide la disociación de los IRAKs activos y del factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF6) del complejo receptorial (Fig. 20). A través de este mecanismo, IRAK-M previene la activación de la vía de señalización mediada por TLR, suprimiendo la producción de los mediadores pro-inflamatorios controlados por esta vía (Kobayashi y col, 2002; Nakayama y col, 2004). En consecuencia, los macrófagos deficientes para IRAK-M producen niveles más altos de citoquinas proinflamatorias en respuesta a la estimulación de TLR/IL-1R. Basándose en los resultados anteriores, los niveles de IRAK-M han sido asociados negativamente con la magnitud de la respuesta inflamatoria en sepsis humana, lo cual sugiere un papel prominente de esta pseudoquinasa en la regulación de la homeostasis inmune en enfermedades humana, tanto infecciosas como no infecciosas (Escoll y col., 2003; López-Collazo y col., 2006; Biswas y col., 2009; Hubbard y col., 2010).

El fenómeno de “tolerancia” a endotoxina (TE) ha sido definido como un estado de reducida respuesta del sistema inmune a una exposición a endotoxina tras una primera infección bacteriana. Desde que Paul Beeson acuñara ese término por primera vez (Beeson, 1946), ha recibido otras denominaciones, como “desactivación”, “desensibilización”, o “refratariedad”. Freudenberg y Galanos demostraron que los macrófagos son mediadores críticos de la TE en ratones (1988), aunque posteriormente se observó también en humanos (Granowitz y col., 1993; Cavillon and Adib-Conquy, 2006; Broad y col., 2006). La TE ha sido observada en células circulantes de pacientes sépticos que poseen reducida capacidad para producir citoquinas proinflamatorias en respuesta a la estimulación *ex vivo* con LPS (Faas y col., 2002; Escoll y col., 2003). Se han realizado numerosos estudios en los que se ha tratado de dilucidar las bases moleculares del fenómeno de TE; así, la falta de respuesta a LPS ha sido asociada a una disminución de la expresión de NF- κ B, una sobreexpresión de IRAK-M, una

desregulación de TLR-4, o una inhibición de la fosforilación de IRAK-1 (del Fresno y col., 2009).

Los macrófagos humanos tolerantes, con elevada expresión de IRAK-M, se caracterizan por poseer una disminuida capacidad de presentación de antígenos, presentan altos niveles de CD64, aumento en la actividad fagocítica y disminución de la expresión de NF- κ B (del Fresno y col., 2009; Biswas y López-Collazo, 2009; Soares-Schamoski y col., 2012). Por el contrario, los macrófagos de ratones deficientes en IRAK-M muestran una aumentada producción de citoquinas inflamatorias junto con una incapacidad para adquirir un estado de tolerancia en respuesta a LPS (Akira y Takeda, 2004). Debido a esto, la tolerancia a endotoxina está determinada por una disminuida producción de citoquinas en respuesta a una segunda estimulación de LPS, por lo que la producción de TNF- α inducida por este estímulo es utilizada como indicador del grado de tolerancia (Escoll y col., 2003). La significancia del fenómeno de tolerancia a endotoxina es crucial ya que representa un mecanismo de adaptación de las células inmunes por el cual se impide una activación excesiva de las mismas en respuesta a una infección bacteriana persistente.

Tres observaciones mencionadas previamente en esta sección de Introducción permiten lanzar la hipótesis de que IRAK-M podría contribuir al efecto antiinflamatorio de nicotina a través del α_7 nAChR en células inmunes humanas: 1) la superposición de expresión de IRAK-M y α_7 nAChRs en macrófagos humanos; 2) el decisivo papel regulador negativo de esta pseudoquinasa en patología humana que cursa con inflamación sistémica; y 3) la participación de otros reguladores negativos de la vía de señalización mediada por TLR en el efecto antiinflamatorio de nicotina en células inmunes. Sin embargo, para que la anterior hipótesis sea factible es necesario demostrar que existe una comunicación entre el α_7 nAChR y el IRAK-M, y esto es lo que se ha tratado de dilucidar en este trabajo de tesis. En el caso de que esta comunicación sea cierta, es interesante evaluar también si la sobreexpresión de IRAK-M inducida por nicotina es capaz de generar macrófagos “tolerantes” de forma similar a como lo hace el LPS.

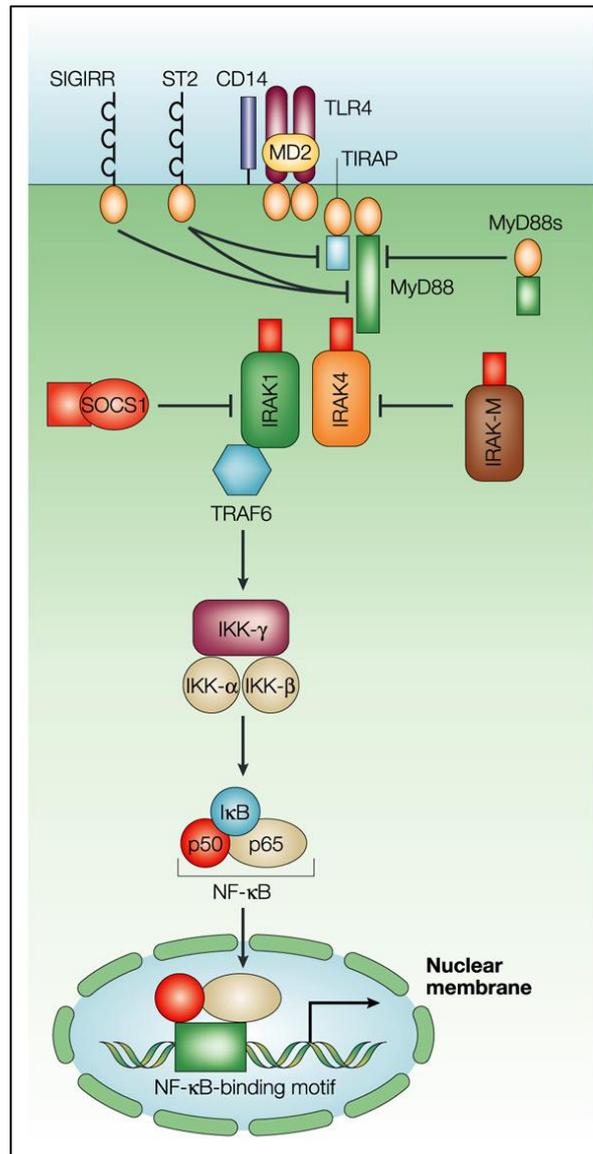


Figura 20.- Regulación negativa de la vía de señalización mediada por TLR4. La estimulación de TLR4 activa la asociación de MyD88, IRAK-4 e IRAK-1. Ello condiciona el reclutamiento de TRAF6 al complejo receptorial y su activación; el TRAF6 activado fosforila y activa al complejo IKK que, a su vez, fosforila IKβ produciendo la liberación del NF-κB y su translocación al núcleo. IRAK-M inhibe la disociación del complejo IRAK-1/IRAK-4 desde el receptor, lo que tiene como consecuencia la no activación del complejo IKK, por lo que NF-κB no se activaría. (Tomado de Akira y col., 2004).

Objetivos

Se ha identificado un nuevo gen (*CHRFAM7A*) en el genoma humano resultante de la duplicación parcial del gen (*CHRNA7*) que codifica para la subunidad α_7 del nAChR. El transcrito del nuevo gen, denominado $\text{dup}\alpha_7$, es expresado en células inmunes y cerebro, al igual que el ARNm de α_7 . El papel funcional del nuevo gen ha sido recientemente revelado por nuestro grupo mediante estudios de expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus*; $\text{dup}\alpha_7$ se comporta como un dominante negativo de la actividad del α_7 nAChRs (de Lucas-Cerrillo y col., 2011). Sin embargo, no ha sido posible identificar el mecanismo por el que $\text{dup}\alpha_7$ actúa de este modo en ovocitos ni tampoco si la interacción entre α_7 y $\text{dup}\alpha_7$ se produce también en células de mamíferos, especialmente en células inmunes. Ello se debe a la falta de disponibilidad de anticuerpos específicos capaces de distinguir entre una y otra subunidad nicotínica dada la similitud de sus secuencias peptídicas.

Por otra parte, es bien conocido que el SNC interactúa dinámicamente con el sistema inmune modulando la inflamación a través de mecanismos humorales y neuronales. Entre estos últimos, destaca la regulación de la respuesta inflamatoria sistémica por el nervio vago, mecanismo que ha sido denominado “vía colinérgica antiinflamatoria”. La activación vagal, a través de la liberación de ACh y la consiguiente interacción con α_7 nAChRs de macrófagos y otras células inmunes, reduce la producción de citoquinas proinflamatorias desde estas células amortiguando la inflamación. Algunos reguladores negativos de la respuesta inmune innata mediada por TLR, como STAT3, PI3K o SOCS-3, han sido implicados en el anterior efecto antiinflamatorio mediado por el α_7 nAChR; sin embargo, la participación de otro regulador negativo, como el IRAK-M, en este último efecto permanece aún por explorar.

En base a lo anterior, en el presente proyecto de Tesis Doctoral nos planteamos los siguientes OBJETIVOS:

- [1] Estudiar el mecanismo por el que $\text{dup}\alpha_7$ interacciona con α_7 en líneas celulares de mamífero.
- [2] Evaluar las consecuencias funcionales de dicha interacción, particularmente a nivel de la inflamación en macrófagos.

- [3] Analizar si el regulador negativo de la inflamación inducida por TLR en macrófagos, el IRAK-M, participa también en el efecto antiinflamatorio mediado por el α_7 nAChR.

Para abordar los dos primeros objetivos se recurrirá a técnicas de ADN recombinante con objeto de preparar diversas construcciones conteniendo los ADNc de α_7 y $\text{dup}\alpha_7$ “etiquetados” con los epítomos –HA– y –myc/His–, o ligados a las proteínas de fusión GFP o Cherry. Estas construcciones serán utilizadas para la posterior expresión e identificación de ambas subunidades nicotínicas en diversos tipos celulares de mamíferos.

Materiales y Métodos

1 SOLUCIONES, REACTIVOS, MEDIOS DE CULTIVO, KITS COMERCIALES Y ANTICUERPOS EMPLEADOS.

Tabla 2: Soluciones utilizadas.

| Solución | Uso | Composición |
|---------------------|----------------------------------|--|
| PBS | Varios | NaCl 136 mM; KCl 2 mM; Na ₂ HPO ₄ 8 mM; KH ₂ PO ₄ 2 mM; pH=7,4. |
| TTBS | Inmunoblot | Tris-HCl 20 mM; NaCl 136,8 mM; 0,1% Tween-20; pH= 7,5. |
| HBSS | Inmunofluorescencia | NaCl 137 mM; KCl 5,4 mM; Na ₂ HPO ₄ 0,25 mM; KH ₂ PO ₄ 0,44 mM; CaCl ₂ 1,3 mM; MgSO ₄ 1 mM; NaHCO ₃ 4,2 mM. |
| NP-40 | Extracción proteínas de membrana | 1% NP-40; NaCl 150 mM; Tris-HCl 50 mM; EDTA 1 mM; pH=8; 1% inhibidores de proteasas, ortovanadato sódico 50 mM, fluoruro sódico 50 mM, beta-glicerolfosfato 50 mM. |
| Tampón lisis | Extracción proteínas citosólicas | NaCl 150 mM; Tris-HCl 50 mM; EDTA 1mM; pH=8; 1% inhibidores de proteasas. |

Tabla 3: Productos y reactivos empleados.

| Reactivos | Uso | Casa comercial |
|---|--|-------------------|
| HAM-F10, DMEM, OptiMEM y RPMI-1640 | Medios cultivo | GIBCO, Invitrogen |
| Suero fetal bovino (SFB), Suero caballo (HS) | Líneas celulares | GIBCO, Invitrogen |
| Suero humano | Cultivos primarios macrófagos | LONZA |
| Wheat Germ Agglutinin Alexa Fluor 647 conjugate (WGA) | Inmunofluorescencia | MOLECULAR PROBES |
| Phalloidina Alexa Fluor 555 conjugate | Inmunofluorescencia | MOLECULAR PROBES |
| DAPI | Inmunofluorescencia | MOLECULAR PROBES |
| αBgtxy αBgtx -FITC conjugate | Bloqueo e inmunomarcaje del α_7 nAChR | SIGMA |
| PNU120596 | Modulador alostérico positivo del α_7 nAChR | TOCRIS BIOSCIENCE |
| Lipopolisacárido (LPS) | Estimulación macrófagos | SIGMA |
| Nicotina | Agonista del α_7 nAChR | SIGMA |
| M-CSFh | Factor diferenciador de macrófagos | PEPROTECH |
| Prolong Gold Antifade Reagent | Inmunofluorescencia | MOLECULAR PROBES |
| Interferin | Transfección | POLYPLUS |
| Lipofectamina 2000 | Transfección | INVITROGEN |
| Dynabeads Protein G | Co-inmunoprecipitación | INVITROGEN |
| Biopartículas Zymosan <i>S. cerevisiae</i> conjugadas con FITC | Fagocitosis | MOLECULAR PROBES |

Tabla 4: Kits comerciales empleados.

| Kits | Uso | Casa comercial |
|--|--------------------------------|--------------------|
| <i>RNeasy Mini Kit</i> | Extracción ARN total | QIAGEN |
| TaqMan Reverse Transcription Reagent | Transcripción reversa | APPLIED BIOSYSTEMS |
| iTaq Fast SYBR Green Supermix with ROX | PCR en tiempo real | BIO-RAD |
| QIAquick Gel Extraction Kit | Extracción bandas ADN de geles | QIAGEN |
| Wizard Plus SV Minipreps | Limpieza bandas ADN extraídas | PROMEGA |
| Cell Line Nucleovector Kit-V | Kit de transfección | AMAXA BIOSYSTEMS |
| TNF-α ELISA development kit (humano, ratón) | Cuantificación TNF- α | PREPROTECH |
| ECL Plus | Western blot | GE HEALTHCARE |
| BCA Protein Assay Kit | Cuantificación proteínas | THERMO SCIENTIFIC |
| Dual-Luciferase Reporter Assay System | Ensayo luciferasa | PROMEGA |
| In-Fusion HD Cloning Kit | Clonación | CLONTECH |

Tabla 5: Relación de anticuerpos primarios utilizados. WB: western blot; CF: citometría de flujo; IF: inmunofluorescencia, IPP: inmunoprecipitación.

| Anticuerpo | Casa comercial | Técnica | Dilución | Especie de preparación | Epítipo |
|---------------------------------------|-----------------|-----------------|----------------------|------------------------|---|
| anti- IRAK-M | MILLIPORE | WB | 1:1000 | Conejo, policlonal | Aminoácidos 581-596 |
| anti- β actin | SANTA CRUZ | WB | 1:100 | Cabra, monoclonal | Región C-terminal |
| anti-c-myc | ROCHE | WB, IPP, CF, IF | 1:1000; 1:200; 1:100 | Ratón, monoclonal | Aminoácidos 408-439 de c-myc |
| anti- HA | SIGMA | WB, CF, IF | 1:2000; 1:200; 1:100 | Conejo, monoclonal | Amino ácidos 98-106 de HA |
| mab306 | SIGMA | IF | 1:3000 | Ratón, monoclonal | Amino ácidos 380-400 de subunidad $\alpha 7$ rata |
| anti-NF-κB | CELL SIGNALLING | IF | 1:50 | Conejo, monoclonal | Proteína p65 de NF- κ B |
| anti-calnexina | SIGMA | IF | 1:100 | Conejo, monoclonal | Amino ácidos 573-592 |
| anti-CD14 conjugado APC | BD Pharmigen | CF | 1:20 | Ratón, monoclonal | No documentado |

Tabla 6: Relación de anticuerpos secundarios utilizados. WB: western blot; CF: citometría de flujo; IF: inmunofluorescencia.

| Anticuerpo | Casa comercial | Técnica | Dilución | Especie de preparación | Conjugado |
|------------------------|-------------------------|---------|----------|------------------------|-----------------|
| anti-conejo IgG | MOLECULAR PROBES | IF | 1:400 | Cabra | Alexa Fluor 555 |
| anti-conejo IgG | MOLECULAR PROBES | CF | 1:400 | Cabra | Alexa Fluor 488 |
| anti- ratón IgG | MOLECULAR PROBES | IF | 1:400 | Cabra | Alexa Fluor 488 |
| anti- ratón IgG | MOLECULAR PROBES | CF | 1:400 | Cabra | Alexa Fluor 647 |
| anti-conejo IgG | JACKSON INMUNO RESEARCH | WB | 1:5000 | Cabra | HRP |
| anti- ratón IgG | JACKSON INMUNO RESEARCH | WB | 1:5000 | Cabra | HRP |
| anti-cabra IgG | JACKSON INMUNO RESEARCH | WB | 1:5000 | Cabra | HRP |

2 CULTIVOS CELULARES.

A continuación se relacionan los distintos tipos celulares correspondientes a los cultivos primarios y a las líneas celulares utilizados en este estudio. La Figura 21 recoge las imágenes en campo claro de cada tipo celular tomadas en el microscopio invertido.

2.1. Línea primaria de macrófagos humanos.

A partir de concentrados de células blancas y plaquetas de sangre periférica humana (buffy coats) proporcionados por el Centro de Trasfusiones de la Comunidad Autónoma de Madrid, se procedió al aislamiento de células mononucleares por centrifugación en un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque. Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) aisladas después del gradiente fueron lavadas con PBS y sometidas a una siembra diferencial en una placa durante 1 h utilizando un medio RPMI sin suero. De esta manera, se consigue separar la población enriquecida de monocitos constituida por las células que se adhirieron a la placa (10% del total de células sembradas inicialmente). Estos monocitos se incubaron a 37°C, en atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de O₂, por diferentes periodos de tiempo (entre 3-12 días) con medio RPMI conteniendo 5% suero humano junto con M-CSFh (2 ng/ml). Los macrófagos humanos diferenciados a partir de los monocitos (MØ) fueron utilizados para analizar la conexión entre el α_7 nAChR y el regulador negativo de la inflamación IRAK-M.

2.2. Línea celular RAW 264.7 de macrófagos de ratón.

Estas células fueron obtenidas de ATCC (American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA) y cultivadas con medio DMEM suplementado con 10% SFB y Glutamax 1X y sembradas en diferentes soportes (placas Petri de 60mm, o de 24 pocillos, así como frascos de cultivo T75), dependiendo del experimento a realizar. Las células fueron mantenidas en incubador a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de O₂. Se utilizaron estas células para los estudios de expresión de IRAK-M inducida por nicotina, así como para la transfección de la construcción de dup α_7 -myc y NF- κ B luciferasa. Esta línea celular expresa endógenamente el α_7 nAChR (Li y col., 2009; Tsoyi y col., 2011) así como la chaperona RIC-3 (Li y col., 2009).

2.3. Línea celular GH4C1 de pituitaria de rata.

Este tipo celular, de carácter neuronal, no expresa endógenamente receptores nicotínicos, pero muestra una alta eficiencia para la expresión de α_7 nAChR foráneos con actividad funcional debido a la expresión endógena de la chaperona RIC-3 necesaria para correcto plegamiento y ensamblaje de subunidades α_7 (Landsdell y col., 2005; Bond y col., 2009; Koperniak y col., 2013). Las células fueron cultivadas en medio HAM-F10, 15% HS y 2,5% SFB y mantenidas en incubador a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de O₂. Esta línea celular fue utilizada para expresar diferentes construcciones de subunidades nicotínicas.

2.4. Línea celular HEK293 procedente de células embrionarias de riñón humano.

Estas células han sido ampliamente utilizadas para la transfección de numerosos tipos de proteínas. Las células fueron cultivadas en medio DMEM, 10% SFB y mantenidas en incubador a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de O₂. En este trabajo, este tipo celular ha sido utilizado para expresar diversas construcciones de subunidades nicotínicas.

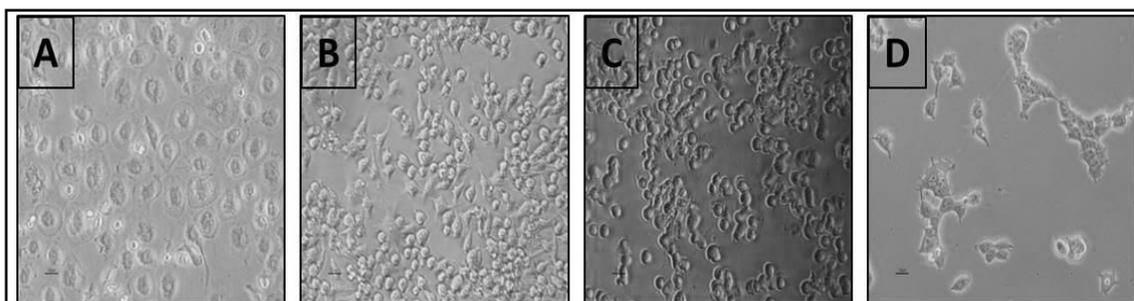


Figura 21.- Imágenes representativas de los diferentes tipos celulares empleados en este estudio. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio invertido acoplado a una cámara digital (Nikon Eclipse TE2000). A) Monocitos humanos diferenciados a macrófagos; B) células RAW264.7; C) células GH4C1; y D) células HEK293.

3 TECNICAS DE ADN RECOMBINANTE PARA PREPARAR $\text{dup}\alpha_7$.pcDNA3.1/myc-His Y α_7 -HA.pcDNA3.1.

A continuación se describen las técnicas de ADN recombinante seguidas para la preparación de las construcciones de $\text{dup}\alpha_7$ y α_7 etiquetadas con “myc” y “HA” respectivamente. Un esquema de los pasos seguidos durante dicha preparación es mostrado en la sección de Resultados (Figs. 22, 23 y 24).

3.1. Incorporación, por PCR, de dianas para enzimas de restricción y del epítipo HA en las subunidades nicotínicas.

El proceso se inició con la amplificación, por PCR, de las subunidades $\text{dup}\alpha_7$ y α_7 a partir de los plásmidos $\text{dup}\alpha_7$.pSP64T y α_7 .pcDNA3.1; para ello se utilizaron las parejas de cebadores 1 y 2, respectivamente (Tabla 7). Estos cebadores fueron diseñados de forma que contenían secuencias diana para las enzimas de restricción XbaI y BamHI, respectivamente. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 30 μl , utilizando 50 ng del plásmido, 1 pmol de cada oligonucleótido cebador, 100 μM de dNTPs y 5U de la enzima Taq polimerasa (Expand High Fidelity, de Roche). La reacción de PCR consistió en 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C, y 2 min a 72°C, precedidos de 1 min a 94°C y seguidos de 7 min de extensión a 72°C. De esta manera, se obtuvieron los ADNc de $\text{dup}\alpha_7$ y α_7 conteniendo, en su extremo 5', la diana para XbaI y BamHI, respectivamente.

La secuencia HA codifica para un epítipo de 9 aminoácidos (YPYDVPDYA) perteneciente a la glucoproteína antigénica hemaglutinina del virus de la influenza humana. La inserción de esta secuencia en el ADNc de α_7 se realizó mediante una segunda PCR, utilizando como molde el producto obtenido en la primera PCR y la pareja 3 de cebadores de la Tabla 7. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 30 μl , utilizando 2 μl de molde, 5% DMSO, 1 pmol de cada cebador, 100 μM de dNTPs y 5U de la enzima Taq polimerasa (Expand High Fidelity, de Roche). La reacción consistió en 5 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 62°C, y 1 min 30 s a 72°C, y 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 70°C, y 1 min 30 s a 72°C, precedidos por 1 min a 94°C y seguidos de 7 min de extensión a 72°C. El resultado final la 2ª PCR fue un ADNc de α_7 con diana de

corte para la enzima BamHI en el extremo 5', seguido por la secuencia de HA y la secuencia de corte para XbaI en el extremo 3'.

Tabla 7: Parejas de cebadores utilizados en la PCR para incorporar dianas para las enzimas de restricción XbaI (5' TCTAGA) y BamHI (5' GGATCC) en las construcciones de $\text{dup}\alpha_7$ y α_7 , así como la etiqueta HA en la construcción de α_7 . Los sitios de reconocimiento para las enzimas en los cebadores antisentido de las parejas 1 y 2 aparecen subrayados en negrita, mientras que la secuencia HA en el cebador antisentido de la pareja 3 es resaltada en verde.

| Pareja | | Oligonucleótidos | T° hibrid |
|--------|-------------|--|--------------|
| 1 | Sentido | SP6: 5'- GATTTAGGTGACACTATAG-3' | 55°C |
| | Antisentido | Rv: 5'- <u>TCTAGA</u> CGCAAAGTCTTTGGACACGGC-3' | |
| 2 | Sentido | T7: 5'- TAATACGACTCACTATAGGG-3' | 55°C |
| | Antisentido | Rv1: 5'-AACATCGTATGGG TAGGATCC CGCAAAGTCTTTGGACACGCC-3' | |
| 3 | Sentido | Fw: 5'- CCACCATGCGCTGCTCGCCG-3' | 70°C |
| | Antisentido | Rv2: 5'- <u>GTCTAGA</u> TCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTA <u>GGATCCC</u> GCA-3' | |

Los diferentes productos amplificados se separaron por electroforesis en un gel de agarosa 1,2 % con bromuro de etidio, utilizando un marcador de peso molecular de ADN (100 pb o 1 kb; Biotools). Las bandas correspondientes a los productos amplificados con el tamaño previsto se extrajeron del gel y purificaron con el kit de Qiagen (QIAquick Gel Extraction Kit).

3.2. Clonación de las subunidades nicotínicas obtenidas en diferentes vectores de expresión.

A. *Clonación del inserto en el vector intermedio pGEM-T Vector Easy*

Los ADNc de $\text{dup}\alpha_7$ y α_7 -HA, obtenidos en el apartado anterior, fueron clonados mediante ligación en el vector intermedio pGEM-T Vector Easy (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción de ligación se llevó a cabo a temperatura ambiente toda la noche, utilizando 2,5 μl de solución de ligación, 0,5 μl de T-Vector y 1,5 μl del producto a ligar. Posteriormente, se procedió a la transformación de células competentes de *E. Coli* con los productos ligados al vector. Las células fueron sembradas en placas conteniendo medio de (LB)-agar suplementadas con 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de ampicilina e IPTG y X-Gal. Se seleccionaron aquellas colonias que habían incorporado el fragmento de la ligación (blancas), las cuales se pusieron a crecer, de forma individual, en medio LB en agitación a 37°C durante toda la noche. El plásmido fue extraído y aislado de las células utilizando el kit de purificación de ADN de

Promega (Wizard Plus SV Minipreps, DNA Purification System). Una vez obtenidos los diferentes plásmidos en pGEM-T, se procedió a digerir estos con las correspondientes enzimas de restricción.

B. Clonación del inserto en los vectores finales pcDNA3.1 y pcDNA3.1/myc-His

La transferencia de los ADNc de α_7 -HA y dup α_7 desde el vector intermedio pGEM-T Vector Easy a los vectores finales pcDNA3.1 y pcDNA3.1/myc-His respectivamente, se llevó a cabo utilizando las enzimas de restricción adecuadas. La Tabla 8 recoge los diferentes vectores utilizados en este estudio y el empleo que se les dio a los mismos. El vector pcDNA3.1 es ampliamente empleado en líneas celulares de mamíferos para aumentar la expresión de aquellas proteínas clonadas en su sitio de clonación múltiple, y ha sido utilizado en este estudio para la clonación final y posterior expresión del ADNc de α_7 -HA dando lugar a la correspondiente proteína con el epítipo –HA- en su C-terminal. Este mismo vector, conteniendo en su secuencia el residuo de poli-histidina y el epítipo myc de 10 aminoácidos (EQKLISEEDL) del proto-oncogen *c-myc* (pcDNA3.1/myc-His) fue el escogido para la clonación final del ADNc de dup α_7 y su posterior expresión dando lugar a la subunidad dup α_7 con el epítipo –myc- en su C-terminal.

El traspaso del ADNc de α_7 -HA y dup α_7 desde el vector pGEM-T al correspondiente vector final se realizó utilizando las parejas de enzimas de restricción NotI/XbaI. El producto digerido se separó electroforéticamente en gel de agarosa y se purificó utilizando el kit de Qiagen anteriormente mencionado. Finalmente, se procedió a la ligación del inserto al vector final correspondiente, la transformación de células competentes, y la obtención del plásmido con el kit de Promega anteriormente indicado. Por otro lado, el traspaso del ADNc de RIC-3 desde el vector pSP64T al correspondiente vector final se realizó utilizando las parejas de enzimas de restricción XbaI/Kpn.

Tabla 8: Tipos de plásmidos utilizados para la preparación de las construcciones α_7 -HA, dup α_7 -myc y RIC-3.

| Plásmidos | Utilización |
|--------------------|--|
| pGEM-T Vector Easy | Vector intermedio para la clonación de las subunidades dup α_7 y α_7 -HA |
| pcDNA3.1 | Vector final de la construcción de α_7 -HA y RIC-3 |
| pcDNA 3.1/myc-His | Vector final de la construcción de dup α_7 conteniendo el epítipo c-myc |

4 TECNICAS DE ADN RECOMBINANTE PARA LA PREPARACIÓN DE α_7 .pmaxGFP Y dup α_7 .pmCherry.

A continuación se describe la metodología seguida para la preparación de las subunidades nicotínicas α_7 y dup α_7 ligadas a las proteínas de fusión “GFP” y “Cherry” respectivamente. Las Figuras 22 y 25 de la sección de Resultados muestran un esquema de los pasos seguidos durante dicha preparación.

4.1. PCR para la incorporación de dianas para enzimas de restricción a las subunidades nicotínicas.

El proceso se inició con la amplificación, por PCR, de las subunidades α_7 y dup α_7 a partir de los plásmidos α_7 .pSP64T y dup α_7 .pSP64T; para ello se utilizaron las parejas de cebadores 1 y 2 indicadas en la Tabla 9. Estos cebadores se diseñaron conteniendo secuencias diana para diferentes enzimas de restricción, así como secuencias correspondientes al vector final de clonación. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 30 μ l, utilizando 50 ng del plásmido, 1 pmol de cada oligonucleótido cebador, 100 μ M de dNTPs y 5U de la enzima Taq polimerasa (Expand High Fidelity, de Roche). La reacción consistió en 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C, y 2 min a 72°C, precedidos de 1 min a 94°C y seguidos de 7 min de extensión a 72°C. De esta manera, se obtuvieron los ADNc de dup α_7 y α_7 conteniendo, en su extremo 5', una diana para las enzimas de restricción de SaII y/o NheI cada una.

Tabla 9: Parejas de cebadores utilizadas en la PCR para incorporar dianas para enzimas de restricción así como una secuencia común con el vector final en las construcciones de α_7 y dup α_7 . Los sitios de reconocimiento para las enzimas NheI (5' GCTAGC) y SaII (5' GTCGAc) aparecen en negrita subrayados, mientras que la secuencia compartida con el vector final se muestra resaltada en rojo.

| Pareja | | Oligonucleótidos |
|--------|-------------|---|
| 1 | Sentido | Alpha7-max-F: 5'- TACCGAAGCCGCTAGC CCACCATGCGCTGCTCGC -3' |
| | Antisentido | Alpha7-max-Rv: 5'- GACCGGTAGCGCTAGC CCCAGCAAAGTCTTTGGACAC-3' |
| 2 | Sentido | Dup-cherry-F: 5'- GAATTCTGCAGTCGAC ATGCAAAAATATTGCATCTACC -3' |
| | Antisentido | Dup-cherry-Rv: 5'- CCGCGGTACCGTCGAC GCAAAGTCTTTGGACACGG-3' |

Los diferentes productos amplificados se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa 1,2 %, con bromuro de etidio, utilizando un marcador de peso molecular de ADN (100 pb o 1 kb; Biotools). Las bandas correspondientes a los

productos amplificados con el tamaño previsto se extrajeron del gel y purificaron con el kit de Qiagen anteriormente descrito.

4.2. Clonación de las subunidades obtenidas en los vectores de expresión pmaxGFP y pmCherry-N1.

Los ADNc de α_7 y $\text{dup}\alpha_7$, obtenidos en el apartado anterior, fueron clonados mediante ligación en los vectores finales pmaxGFP y pmCherry respectivamente, utilizando el método IN-FUSION desarrollado por Clontech siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, 5 μl del producto de PCR obtenido fue incubado 15 min a 37°C con la solución Cloning Enhancer del kit; posteriormente, se llevó a cabo la reacción de ligación, utilizando 2 μl del tampón de ligación, 1 μl de la enzima In-Fusion, 0,5 μl del correspondiente vector y 1,5 μl del producto a ligar. La reacción consistió en 15 min a 37°C, y 15 min a 50°C. Posteriormente, se procedió a la transformación de células competentes de *E. Coli* con los productos ligados al vector. Las células fueron sembradas en placas de (LB)-agar suplementadas con 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de ampicilina e IPTG y X-Gal. Se seleccionaron las colonias blancas que habían incorporado el fragmento de la ligación, las cuales se pusieron a crecer, de forma individual, en medio LB en agitación a 37°C durante toda la noche. El plásmido fue extraído y aislado de las células utilizando el kit de purificación de ADN de Promega. De esta manera se obtuvieron finalmente las subunidades α_7 y $\text{dup}\alpha_7$ fusionadas en su extremo C terminal a GFP y a Cherry respectivamente.

Tabla 10: Tipos de plásmidos utilizados para la preparación de las construcciones α_7 -GFP y $\text{dup}\alpha_7$ -Cherry.

| Plásmidos | Utilización |
|-----------|---------------------------------------|
| pmaxGFP | Vector final que codifica para GFP |
| pmCherry | Vector final que codifica para Cherry |

5 PROCEDIMIENTOS DE TRANSFECCIÓN.

5.1. Transfección con Lipofectamina.

La Lipofectamina consiste en una formulación liposomal catiónica capaz de formar complejos con moléculas de ácidos nucleicos cargadas negativamente para que éstas puedan superar la repulsión electrostática de la membrana celular. De esta manera, el complejo formado puede fusionarse con la membrana plasmática cargada negativamente de las células vivas, permitiendo que el ácido nucleico pueda llegar al citoplasma y, por tanto, estar accesible para el proceso de replicación o expresión celular. El resultado final del uso de la lipofectamina es el incremento de la eficacia de la transfección ADN o ARN (incluyendo ARNm y ARNi) en cultivos celulares *in vitro*.

Utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen), se procedió a la transfección de las células GH4C1 o HEK293 con diversas construcciones mencionadas anteriormente, tal como se indica en la sección de resultados. El proceso de transfección, iniciado cuando las células tenían $\approx 60\%$ de confluencia, se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se preparó la mezcla del medio OptiMEM (Gibco, Invitrogen) y Lipofectamina y por otro lado el medio OptiMEM conteniendo el plásmido. Tras mezclar ambas soluciones, se procedió a la incubación de las células en el anterior medio durante 4-6 horas. Transcurrido dicho periodo, el medio fue sustituido por medio de cultivo fresco en el que se mantuvieron las células por un periodo adicional de 24-48 horas antes de iniciar el diseño experimental.

5.2. Nucleofección.

La nucleofección es un método de transfección que permite la transferencia de ácidos nucleicos, tales como ADN, ARN, ARNi, en células de mamíferos hasta ahora considerados difíciles o incluso imposibles de transfectar. Esta técnica, basada en el método físico de la electroporación, utiliza una combinación de parámetros eléctricos, generados por un dispositivo llamado Nucleofector, junto con reactivos específicos que favorecen la transferencia directa del sustrato al citoplasma y al núcleo celular. Antes de la introducción de nucleofección, la transferencia génica eficaz en células primarias se había limitado a la utilización de vectores virales, que llevan aparejados riesgos de

seguridad, falta de fiabilidad y alto costo. Así, la nucleofección tiene la capacidad de transfectar incluso células que no se dividen, tales como neuronas y células de la sangre en reposo, frente a otros métodos de transfección no-virales comúnmente utilizados que requieren la división celular para la transferencia de ADN al núcleo.

Las células RAW264.7 en suspensión fueron nucleofectadas utilizando el kit de Lonza (Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit V) específico para esta línea celular. Brevemente, 2×10^6 células fueron resuspendidas en 100 μ l de la solución de nucleofección conteniendo diferentes cantidades de la construcción $\text{dup}\alpha_7\text{.pcDNA3.1/myc-His}$ o del vector vacío con la etiqueta myc (pcDNA3.1/myc-His). La nucleofección se realizó en un Nucleofector (Lonza) utilizando el programa D-032. Finalizado el proceso, las células se sembraron en placas de 24 pocillos dejándolas adherirse a la placa durante un periodo de 24 horas antes de empezar el experimento en cuestión.

5.3. Silenciamiento génico con ARN pequeño de interferencia.

Interferir con la expresión de un gen diana mediante su silenciamiento es un instrumento utilizado para dilucidar el papel de dicho gen en una determinada función celular. En este trabajo se han utilizado las dos parejas de doble hebra de ARN pequeño de interferencia (siRNA; del inglés small interfering RNA) de Invitrogen que aparecen en la Tabla 11. Los dos siRNAs son altamente específicos para la secuencia nucleotídica del ARNm de IRAK-M humano y, por tanto, deberían ser capaces de suprimir la expresión de dicho gen en células humanas. Se siguió el protocolo de silenciamiento previamente descrito (Martinez, 2012), empleando para transfectar los siRNAs el reactivo específico Interferin (Polyplus). Adicionalmente, en un grupo distinto de células, se realizó una transfección paralela de un siRNA control específico para silenciar el gen de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Tabla 11: Pareja de siRNA utilizados para los experimentos de silenciamiento génico.

| Pareja | | Oligonucleótidos |
|-----------------------|-------------|---------------------------------|
| IRAK-M siRNA-1 | Sentido | 5'-CGGAAUUUCUCUGCCAAGCUCUUCU-3' |
| | Antisentido | 5'-AGAAGAGCUUGGCAGAGAAAUCCG-3' |
| IRAK-M siRNA-2 | Sentido | 5'-CCUUCAGGUGUCCUUCUCCUCUAUU-3' |
| | Antisentido | 5'-AUAUACCGAUUCGAAUGUGCCAAGG-3' |

Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos y diferenciadas como se ha detallado anteriormente. A cada pocillo de células se le adicionó medio OptiMEM sin suero (300 μ l). Por otro lado, se preparó una mezcla de medio OptiMEM sin suero conteniendo Interferin y el siRNA que se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación del complejo. Transcurrido dicho periodo, la mezcla (800 μ l de Optimen, 10 μ l de Interferin y siRNA para una concentración final de 1nM por pocillo) fue añadida a las células e incubada durante 6 horas.

6 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOBLOT.

6.1. Extracción de proteínas citosólicas de cultivos celulares.

Las células mantenidas en cultivo fueron lavadas con PBS y lisadas con 200µl de tampón de lisis (Tabla 2). El lisado celular fue seleccionado y centrifugado 13.000 rpm durante 20 min a 4°C; seleccionando el sobrenadante.

6.2. Extracción de proteínas de membrana de cultivos celulares.

Se utilizó el tampón de lisis NP-40 para producir una lisis celular suave para preservar las interacciones establecidas entre proteínas físicamente asociadas, como antesala de los posteriores experimentos de co-inmunoprecipitación. Tras el lavado del cultivo celular con PBS, se añadió a la placa 120 µl de la solución de lisis NP-40, depositando la placa de cultivo sobre hielo con agitación durante 30 minutos. El lisado celular obtenido fue sometido a un movimiento de rotación suave durante 2 h a 4°C en un agitador rotativo vertical. Transcurrido dicho período, se procedió a su centrifugación a 13.000 rpm durante 20 min a 4° C, seleccionando el sobrenadante.

6.3. Inmunoblot (western blot).

Las proteínas fueron cuantificadas utilizando un kit comercial (BCA Protein Assay Kit), siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada extracto proteico (\approx 20-60µg proteína) fue cargado y resuelto en un gel 10% de SDS/PAGE y transferido electroforéticamente a una membrana PVDF (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Tras el bloqueo de la membrana con solución TTBS conteniendo 5% BSA y 5% leche descremada durante 2 horas a temperatura ambiente, se procedió a la incubación de la misma a temperatura ambiente con el anticuerpo primario adecuado (anti-myc, 1 h; anti-HA o anti-IRAK-M, 2 h). Seguidamente, la membrana fue incubada 1 h a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con HRP. Las bandas resultantes fueron reveladas con el reactivo ECL Plus (Amersham, GE Healthcare) y analizadas con el programa Image J (NIH, EEUU).

7 ANALISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS Y DE PARTÍCULAS FAGOCITADAS POR FLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA CONFOCAL.

Todos los procedimientos experimentales que se incluyen en este apartado tuvieron como fin la detección de subunidades nicotínicas endógenas y exógenas, la identificación de diversas estructuras celulares, la localización celular de NF- κ B y la medida de la capacidad fagocítica celular. Para ello se utilizaron distintos tipos de células, según el caso, las cuales fueron sembradas en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos pretratados con polilisina. Tras realizar el procedimiento de marcaje fluorescente específico para cada caso particular, como se detallará a continuación, los cubreobjetos fueron montados sobre portas utilizando el Prolong Gold Antifade Reagent. Todo el proceso culminó con la visualización de la señal fluorescente a través del microscopio confocal *Leica TCS SP5* (Servicios Centrales de Microscopia Óptica y Confocal, UAM), capturando las imágenes con el programa “Confocal Leica”, como se ha descrito previamente (Solís-Garrido y col., 2004; Serantes y col., 2006).

7.1. Identificación de sitios de unión de α Bgtx en macrófagos humanos (MØ).

Para analizar la expresión endógena de α_7 nAChRs funcionales en MØ se utilizó como marcador la α Bgtx-FITC, una toxina específica de este subtipo de receptor conjugada con un fluoróforo. Los monocitos sembrados en cubreobjetos y diferenciados como se ha detallado previamente, fueron incubados con α Bgtx-FITC ($3\mu\text{g}\cdot\mu\text{ml}^{-1}$) durante 30 min y fijados con 4% PFA.

7.2. Marcaje de membrana celular, RE e identificación de receptores expresados en células GH4C1 y HEK293.

Las células, sembradas en cubreobjetos, fueron mantenidas en cultivo durante 24 h. A continuación, se procedió a su transfección con las construcciones pertinentes manteniendo el cultivo por un periodo adicional de 24 h. Transcurrido dicho periodo, se inició el proceso de marcaje de la membrana celular en células vivas, para continuar con la fijación y permeabilización celular y el posterior inmunomarcaje de las subunidades nicotínicas expresadas. Brevemente, el marcaje de membrana comenzó con la incubación de WGA conjugada con Alexa Fluor 647 durante 10 minutos a 37°C. Este

producto es una lectina que se une a las glicoproteínas de la membrana reconociendo esta estructura celular. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS, fijadas con 4% PFA durante 8 min a temperatura ambiente, y permeabilizadas con 0,2% Tritón X-100 en PBS durante 10 min. A continuación, las células fueron incubadas 45 min con el producto Image-IT FX Signal Enhancer para prevenir la unión no-específica de los anticuerpos primarios (anti-HA, anti-myc) y secundarios con los que se incubaron las células a continuación. El periodo de incubación fue de 2 h para los anticuerpos primarios y de 1 h para los secundarios, a las diluciones que se especifican en las Tablas 5 y 6. En algunos experimentos, en lugar de la membrana, se marcó otra estructura celular como es el RE. En estos experimentos, prescindiendo de la incubación inicial con WGA, se siguió un protocolo experimental similar al que se acaba de describir pero iniciando el inmunomarcaje con los anticuerpos primarios de las subunidades nicotínicas anti-HA y anti-myc, y siguiendo con el marcate de RE con el anticuerpo primario anti-calnexina. Posteriormente, se incubaron las células con los correspondientes anticuerpos secundarios realizados en cabra y conjugados a un fluoróforo (anti-rata IgG Alexa Fluor-555, anti-ratón IgG Alexa Fluor-488y anti-conejo IgG AlexaFluor-647, respectivamente, a una dilución 1:400).

7.3. Identificación de receptores endógenos y foráneos en células RAW264.7.

Células sembradas en cubreobjetos no-nucleofectadas o nucleofectadas 24 h antes con la construcción dup α_7 -myc fueron lavadas, fijadas y permeabilizadas, como se acaba de describir en el apartado anterior. Posteriormente, las células fueron incubadas 45 min con Image-IT FX Signal Enhancer, para proceder a continuación con el inmunomarcaje del α_7 nAChR endógeno o de la subunidad dup α_7 -myc expresada foráneamente en el caso de las células nucleofectadas. Para ello se incubaron las células con los anticuerpos primarios anti- α_7 (mab306) y anti-myc durante 2 h, y posteriormente con el correspondiente anticuerpo secundario realizado en cabra y conjugado a un fluoróforo (anti-ratón IgG Alexa Fluor-488, a una dilución 1:400) durante 1h. Finalmente, las células fueron incubadas 15 min con el marcador nuclear DAPI disuelto en PBS a una dilución 1:500.

7.4. Evaluación de la actividad de NF- κ B en células RAW264.7.

La localización de NF- κ B en citosol o núcleo, como índice de su grado de activación en respuesta a distintos tratamientos, se realizó en células RAW264.7 no manipuladas o nucleofectadas con la construcción dup α 7-myc o con el vector-myc vacío. Brevemente, células en suspensión nucleofectadas con la construcción dup α 7-myc como se ha descrito previamente, fueron sembradas en cubreobjetos sobre placas de 24 pocillos y mantenidas en cultivo por un periodo de 24 h. En paralelo, se utilizaron células del mismo cultivo no-nucleofectadas, sembradas y mantenidas en cultivo de forma similar. Antes de dar comienzo al marcaje, las células fueron sometidas a diferentes tratamientos que serán detallados en la sección de Resultados. Posteriormente, las células fueron lavadas, fijadas y permeabilizadas como se acaba de describir. Tras su incubación con el medio Image-IT FX Signal Enhancer, las células fueron incubadas durante 2h con el anticuerpo primario pertinente (anti-NF- κ B o anti-myc) y durante 1 h con el correspondiente anticuerpo secundario realizado en cabra y conjugado a un fluoróforo (anti-conejo IgG Alexa Fluor-555 o anti-ratón IgG Alexa Fluor-488 respectivamente, a una dilución 1:400). Finalmente, se llevó a cabo la incubación celular con DAPI para marcar el núcleo, tal como se ha descrito en el apartado anterior.

7.5. Medida de la capacidad fagocítica de macrófagos humanos (MØ).

Macrófagos humanos (MØ) sembrados en cubreobjetos fueron expuestos a distintos tratamientos, tras lo cual se agregó al medio de cultivo una suspensión de partículas fluorescentes de Zymosan-FITC (10 partículas/célula), incubando las células con este medio durante 1 hora a 4°C. Transcurrido ese periodo, las células fueron lavadas para eliminar todas las partículas suspendidas, incubando las mismas con medio de cultivo fresco durante 2 horas a 37 °C para permitir el proceso de fagocitosis de las partículas adheridas a la membrana. Posteriormente, los MØ fueron lavados, fijados y permeabilizados como se ha descrito previamente, procediéndose seguidamente a marcar los microfilamentos (actina-F) del citoesqueleto mediante la incubación celular con una solución de faloidina conjugada (AlexaFluor-555; 1:50) durante 20 min. Tras varios lavados, se procedió finalmente al marcaje nuclear con DAPI. El procesamiento de imagen así como el recuento de las partículas fagocitadas y del número de células en

proceso de fagocitosis se realizó con el programa ImageJ- Cell Counter plugin (National Institutes of Health).

8 TRANSFERENCIA DE ENERGÍA ENTRE FLUOROCROMOS POR RESONANCIA DE FLUORESCENCIA (FRET) PARA ESTUDIAR COLOCALIZACIÓN DE SUBUNIDADES NICOTÍNICAS.

Células GH4C1 cotransfectadas con α_7 .pmaxGFP y dup α_7 .pmCherry utilizando Lipofectamina 2000, como se describió previamente, fueron utilizadas para analizar la colocalización de ambas subunidades nicotínicas mediante experimentos de FRET, del inglés ‘Föster Resonance Energy Transfer’. El valor del FRET es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia entre los dos fluorocromos, por lo que la transferencia de energía entre los mismos solo puede producirse cuando las dos moléculas fluorescentes están muy próximas (10-100 Å) y siempre que la longitud de onda de emisión de una de ellas (donador) coincida con la de excitación de la otra (aceptor). La eficiencia del FRET ($FRET_{ef}$) fue calculada en áreas seleccionadas mediante la técnica del fotoblanqueo del aceptor utilizando el programa del microscopio confocal Leica TCS SP5, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$(FRET_{ef}) = 1 - (D_{pre}/D_{post}) \quad \text{siempre que } D_{post} > D_{pre}$$

Donde D_{pre} y D_{post} representan, respectivamente, la fluorescencia emitida por el donador (α_7 .pmaxGFP) a 508 nm tras la excitación a 488 nm antes y después del fotoblanqueo del aceptor (dup α_7 .pmCherry) usando el láser de 561 nm a la potencia del 75%. Para visualizar la eficiencia del FRET se generaron imágenes pseudo-coloreadas del área seleccionada que iban desde el color azul (no colocalización) hasta el rojo (alta colocalización).

9 CITOMETRÍA DE FLUJO PARA ANALIZAR LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES EN MEMBRANA CELULAR.

9.1. Medida de sitios de unión de α Bgtx-FITC en macrófagos humanos (MØ).

Los monocitos humanos fueron sembrados en placas de 60 mm y diferenciados a macrófagos (MØ) por diferentes periodos de tiempo. Transcurrido dicho periodo, los MØ fueron lavados con PBS, despegados de la placa con una solución PBS conteniendo 5mM EDTA, y finalmente centrifugados para descartar el sobrenadante. El pellet celular fue incubado durante 20 min con una solución de PBS 2 mM EDTA 0,5% SFB y α Bgtx-FITC ($3\mu\text{g}\cdot\mu\text{ml}^{-1}$). Tras centrifugar a 800 rpm durante 6 min, el pellet celular fue incubado 20 min con el anticuerpo anti-CD14 conjugado con el fluoróforo APC. Posteriormente las células fueron lavadas con una solución de PBS 2 mM EDTA y resuspendidas en 500 μl de esta solución. La señal fluorescente emitida por los dos fluoróforos fue captada y analizada por el citómetro de flujo FACScan II equipado con el programa “BD FACS DIVA” (Servicios Centrales del Instituto de Investigación Biomédica “Alberto Sols”, CSIC-UAM).

9.2. Medida de expresión de subunidades α_7 y $\text{dup}\alpha_7$ en células GH4C1 transfectadas.

Las células fueron transfectadas con la construcción α_7 -HA o $\text{dup}\alpha_7$ -myc, o bien con la combinación de ambas construcciones en diferentes proporciones. Transcurrido un periodo de 24 horas, se llevó a cabo el mismo protocolo de marcaje para todos los tipos de transfecciones. La suspensión celular fue centrifugada 6 min a 800 rpm y el pellet lavado con una solución de PBS conteniendo 1% BSA y 1% SFB. Las células fueron incubadas 20 minutos a 4°C con los anticuerpos primarios anti-HA o anti-myc para detectar la expresión en membrana del α_7 nAChR o $\text{dup}\alpha_7$, respectivamente. A continuación, las células fueron incubadas durante 20 min a 4°C y en oscuridad con los correspondientes anticuerpos secundarios realizados en cabra y conjugados a un fluoróforo (anti-conejo IgG Alexa Fluor-488 o anti-ratón IgG Alexa Fluor-647 respectivamente, a una dilución 1:400). Las células fueron nuevamente lavadas y resuspendidas en la anterior solución de PBS, analizando la fluorescencia en la membrana celular por citometría de flujo, como se ha indicado anteriormente.

10 ANÁLISIS DE CO-INMUNOPRECIPITACIÓN DE SUBUNIDADES NICOTÍNICAS.

Esta técnica permite analizar si dos proteínas están físicamente asociadas en la célula. En el caso concreto de este estudio, se analizó la asociación entre las subunidades nicotínicas α_7 y dup α_7 . Para ello se transfectaron células GH4C1 con dup α_7 .pcDNA3.1/myc-His o con la combinación α_7 -HA.pcDNA3.1 y dup α_7 .pcDNA3.1/myc-His utilizando Lipofectamina 2000. Cuarenta y ocho horas más tarde, las células fueron lavadas con PBS y lisadas con la solución de lisis NP-40 para la obtención de las proteínas de membrana, tal como se ha descrito previamente. El material solubilizado se centrifugó a 13.000 rpm durante 30 minutos, y la concentración proteica en el sobrenadante fue cuantificada como se ha descrito en el apartado correspondiente. Para el proceso de co-inmunoprecipitación propiamente dicho se utilizó una suspensión de bolas o esferas magnéticas (Dynabeads G) y el protocolo recomendado por el fabricante. Brevemente, una alícuota (35 μ l) de la anterior suspensión de esferas magnéticas fue incubada durante 90 min a 4°C con el anticuerpo anti-myc. Posteriormente, se procedió a una segunda incubación de la anterior suspensión con lisado proteico celular durante toda la noche a 4°C. Transcurrido dicho período, las bolas fueron lavadas cuatro veces con buffer de lisis frío, agregándoles finalmente 20 μ l de buffer de carga SDS-PAGE. La disociación de las proteínas enlazadas a las bolas se realizó por calentamiento de la muestra a 93°C durante 3 min, pasando seguidamente a analizar las proteínas de interés disociadas mediante inmunoblot.

11 CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TNF- α POR TÉCNICAS DE ELISA.

La concentración de TNF- α [TNF- α], en los sobrenadantes de cultivos de MØ humanos y células RAW264.7 sembrados en multipocillos P6 y P24, se determinó por la técnica de Elisa. Previamente a la determinación de la concentración de la citoquina, las células fueron transfectadas con siRNA de IRA-M, o nucleofectadas con dup α_7 .pcDNA3.1/myc-His, también se utilizó el vector vacío (pcDNA3.1myc-His). Adicionalmente, MØ humanos sin transfectar para estudios de tolerancia. Tras aplicar distintos tratamientos a los cultivos celulares, se determinó la [TNF- α] en 100 μ l del

sobrenadante correspondiente a cada situación experimental. Para ello, se utilizaron los kits comerciales de PreproTech (TNF- α ELISA development kit) de humano y de ratón, dependiendo del tipo celular a ensayar, siguiéndose las instrucciones del fabricante. La [TNF- α] se calculó a partir del valor de absorbancia obtenido en un lector de microplacas (Fluostar Óptima BMG), extrapolarlo la concentración de la citoquina correspondiente a dicho valor en una recta de calibración realizada con concentraciones conocidas y señaladas de TNF- α incluidas en el kit.

12 ENSAYO DEL GEN REPORTERO DE LUCIFERASA.

Este ensayo consistió en una doble transfección celular con los plásmidos pNF- κ B-luc y pRL-TK Renilla. El primer plásmido contiene el gen reportero de luciferasa, cuyo nivel de expresión puede ser determinado por bioluminiscencia utilizando el kit comercial de Promega (Dual-Luciferase Reporter Assay System). La base del ensayo radica en que el plásmido pNF- κ B-luc contiene el gen de luciferasa acoplado a una región conteniendo sitios de reconocimiento para NF- κ B. De esta forma, a través del gen reportero de luciferasa, es posible monitorizar las vías de señalización que activan NF- κ B. Por otra parte, el plásmido pRL-TK Renilla, contiene el gen de Renilla que también genera una señal bioluminiscente. Dado que este último gen no es inducible por estímulos, se utiliza en el ensayo para normalizar la señal debida a la luciferasa. Las células RAW264.7 fueron transfectadas con los plásmidos anteriores, en ausencia o presencia de una tercera transfección con dup α_7 .pcDNA3.1/myc-His; en todos los casos se utilizó Lipofectamina 2000 para la transfección. Tras la siembra celular en placas multipocillos p24, las células fueron expuestas a distintos tratamientos 24 horas más tarde. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS y lisadas con la solución de lisis incluida en el kit comercial de Promega (Passive Lysis Buffer). La bioluminiscencia como índice de la actividad luciferasa fue analizada en el equipo Fluostar Óptima BMG atendiendo a las recomendaciones del fabricante.

13 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA.

13.1. Extracción del ARN total y transcripción reversa (RT).

El ARN total fue extraído de los cultivos de MØ humanos sometidos previamente a distintos tratamientos, para lo cual se utilizó el kit comercial de QUIAGEN (*RNeasy* Mini Kit) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La síntesis del ADN complementario (ADNc) se realizó por RT utilizando el kit comercial de Applied Biosystems (TaqMan Reverse Transcription Reagent) a partir de 1 µg de ARN en un volumen final de 20 µl y la enzima MultiScribe Reverse Transcriptase. La reacción consistió en 10 min a 25°C, 30 min a 48°C y 5 min a 95°C.

13.2. PCR cuantitativa en tiempo real.

Los niveles de ARNm de IRAK-M fueron cuantificados por PCR cuantitativa a tiempo real (PCR-Q) a partir del ADNc previamente obtenido, tal como se ha descrito previamente (de Lucas-Cerrillo y col., 2011). Para la detección de los amplicones se utilizó el método de SYBR Green. Este método se basa en la intercalación del fluoróforo en la doble hebra de ADN que se va formando. De esta manera es factible visualizar en directo el perfil completo de amplificación de la diana objeto de estudio dentro de un amplio rango de magnitud. La reacción de PCR se realizó en el equipo ABI Prism 7500, utilizando el reactivo “iTaq Fast SYBR Green Supermix with ROX” y las parejas de cebadores que se indican en la Tabla 10 correspondientes a IRAK-M y a β2-microglobulina (β2m), utilizado como control interno. La PCR consistió en un paso desnaturante de 30 s a 95°C, 40 ciclos de 5 s a 95°C, y 30 s a 60°C. El análisis de los perfiles de “melting” o “desnaturalización” obtenidos confirmó que cada pareja de cebadores amplificaban un solo producto. El ensayo de PCR-Q para el ARNm de IRAK-M se realizó por triplicado, normalizando posteriormente los valores obtenidos frente a la expresión del control interno. La expresión génica relativa se determinó por el método ΔCt utilizando el programa “Sequence Detection System 1.2 software” (Applied Biosystems).

Tabla 12: Parejas de cebadores utilizados en la PCR-Q para la amplificación del ARNm de IRAK-M y β 2-microglobulina en macrófagos humanos. La pareja para IRAK-M correspondía a la previamente publicada (del Fresno y col., Posones, 2008), y la de β 2m se diseñó partir de la secuencia depositada en NCBI (NCBI, NLH) utilizando el programa Primer-BLAST.

| Pareja | | Oligonucleótidos | T ^o hibridación |
|-----------------------------|-------------|--------------------------------|----------------------------|
| IRAK-M | Sentido | 5'- TTTGAATGCAGCCAGTCTGA-3' | 59 °C |
| | Antisentido | 5'-GCATTGCTTATGGAGCCAAT-3' | |
| β2m | Sentido | 5'-TGCCTGCCGTGTGAACCATG -3' | 65°C |
| | Antisentido | 5'-TGCGGCATCTTCAAACCTCCATGA-3' | |

14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados fueron expresados como media \pm error estándar de la media (E.E.M). El análisis comparativo de dos grupos se realizó mediante el test de la *t* de Student. En caso de comparaciones múltiples se utilizó el análisis de varianza de ANOVA, seguido de un análisis post-hoc utilizando el test de Bonferroni cuando era apropiado. Un valor $p \leq 0,05$ fue considerado el límite de significación estadística.

Resultados

1. OBTENCIÓN DE DIVERSAS CONSTRUCCIONES DE α_7 Y $\text{dup}\alpha_7$ PARA SU EXPRESIÓN HETERÓLOGA EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS.

Dada la similitud entre la secuencia peptídica de la subunidad α_7 y su duplicado parcial $\text{dup}\alpha_7$, no se dispone actualmente de ningún anticuerpo capaz de distinguir entre ambas proteínas. Esta limitación ha impedido que se identifique el mecanismo por el que $\text{dup}\alpha_7$ se comporta como dominante negativo de la actividad funcional del α_7 nAChR en ovocitos de *Xenopus* (de Lucas-Cerrillo y col., 2011). Para superar la anterior limitación, en este trabajo se han utilizado técnicas de ADN recombinante con el objeto de obtener diversas construcciones conteniendo el ADNc de α_7 o de $\text{dup}\alpha_7$ etiquetados con el epítipo –HA– o –myc–, respectivamente. También se han obtenido las construcciones de α_7 y $\text{dup}\alpha_7$ ligadas a las proteínas fluorescentes GFP y Cherry, respectivamente. Finalmente, se ha desarrollado una construcción de RIC-3 en el vector pcDNA para ser expresada en algunos tipos celulares carentes de esta chaperona. Esta última construcción fue preparada a partir de la construcción preparada en el vector psP64T (amablemente cedida por el Prof. Millet Training, Universidad Hebrea de Jerusalem, Israel). La Figura 22 representa, de forma esquemática, las cinco construcciones preparadas y utilizadas en este trabajo, junto con los pasos claves seguidos para la obtención de las mismas.

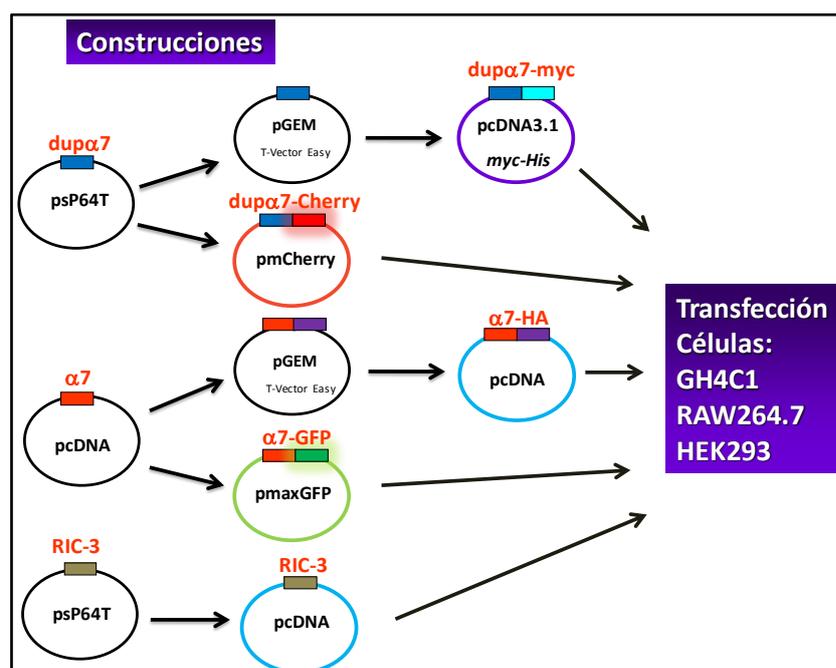


Figura 22.- Esquema de las diferentes construcciones realizadas en este trabajo.

Como se aprecia en la figura, las construcciones α_7 -HA y $\text{dup}\alpha_7$ -myc se llevaron a cabo en tres fases: 1º) amplificando y agregando secuencias de interés mediante PCR; 2º) clonando el producto resultante de la primera PCR en el vector intermedio pGEM-T Vector Easy; y 3º) transfiriendo los ADNc de $\text{dup}\alpha_7$ y α_7 -HA desde el vector intermedio a los correspondientes vectores de expresión finales. Por su parte, las construcciones α_7 -GFP y $\text{dup}\alpha_7$ -Cherry fueron realizadas en dos pasos: 1º) amplificando y agregando secuencias de interés mediante PCR; y 2º) clonando el producto resultante de dicha PCR en los correspondientes vectores finales de expresión.

A continuación, se muestran una serie de figuras (Figuras 23-25) en donde se representan los distintos pasos seguidos para la obtención de cada una de estas construcciones así como los tipos celulares donde éstas fueron expresadas. La metodología seguida en todo el proceso ha sido recogida en detalle en la sección de “Materiales y Métodos”.

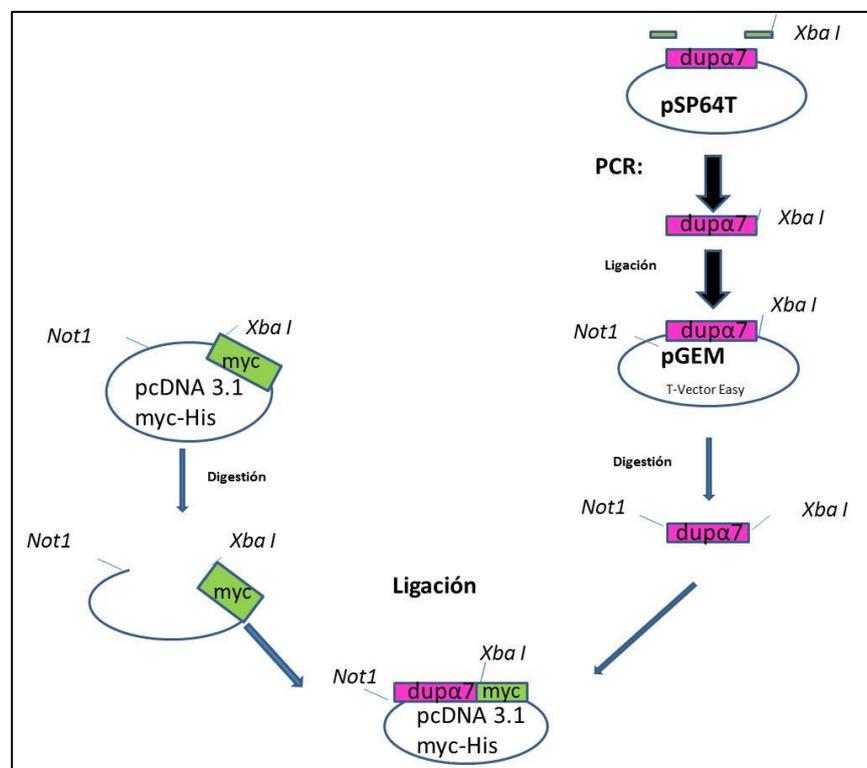


Figura 23.- Esquema del proceso de clonaje de $\text{dup}\alpha_7$ en el vector de expresión pcDNA3.1/myc-His. La construcción fue transfectada en células GH4C1, RAW264.7 y HEK293 para analizar la expresión de $\text{dup}\alpha_7$ a través del epítipo -myc-His-.

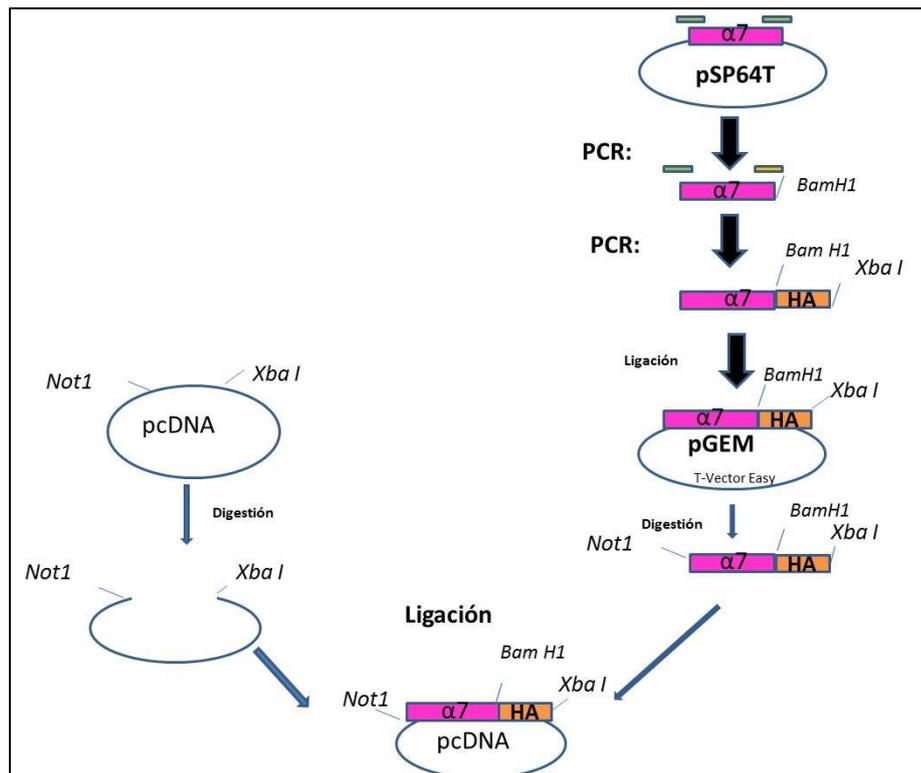


Figura 24.- Esquema del proceso de clonaje de α_7 en el vector de expresión pcDNA3.1. La construcción α_7 -HA.pcDNA3.1 fue utilizada para transfectar células GH4C1 y HEK293 con objeto de visualizar la expresión de la subunidad α_7 a través del epítopo -HA-.

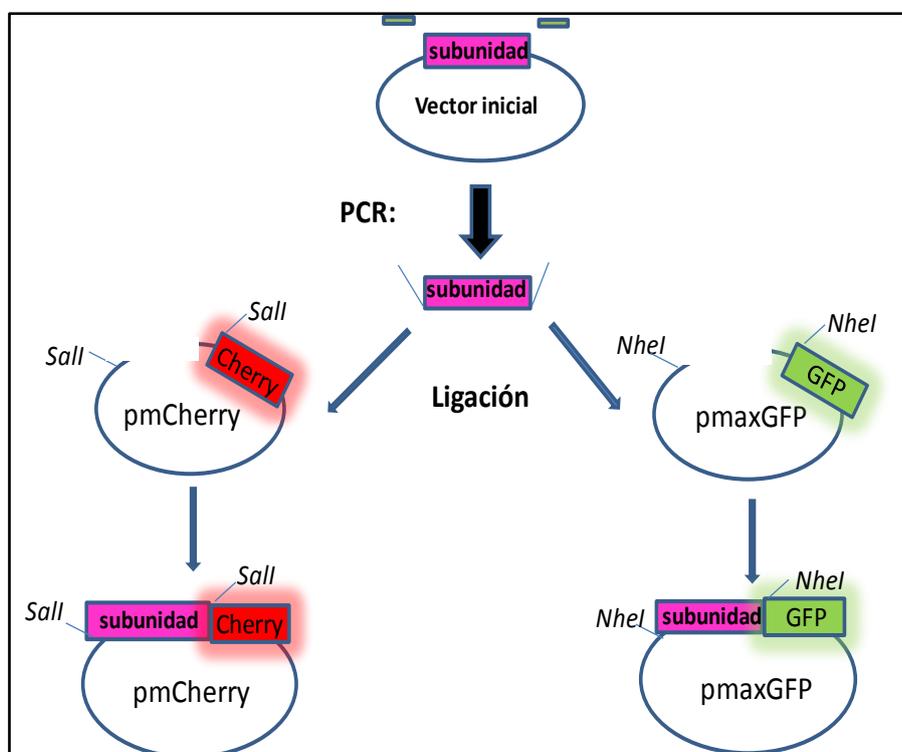


Figura 25.- Esquema del proceso de clonaje de las subunidades α_7 y $\text{dup}\alpha_7$ en los vectores de expresión pmaxGFP y pmCherry. Estas construcciones fueron posteriormente transfectadas en células GH4C1.

2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN INDIVIDUAL DE α_7 -HA Y dup α_7 -myc EN LA LÍNEA CELULAR GH4C1.

Una vez preparadas las diferentes construcciones, se procedió a estudiar su expresión en distintos tipos celulares, dependiendo de la pregunta a responder. En primer lugar, se procedió a realizar un primer análisis de la eficacia de la transfección de α_7 -HA y dup α_7 -myc por separado, así como la distribución celular de las subunidades expresadas. Para ello las células GH4C1 fueron transfectadas con la construcción α_7 -HA.pcDNA3.1 o dup α_7 .pcDNA3.1/myc-His utilizando Lipofectamina 2000. La elección de las GH4C1 se basó en las siguientes características de esta línea celular: 1) expresa eficientemente α_7 nAChRs foráneos; 2) carece de receptores nicotínicos endógenos que puedan enmascarar la expresión heteróloga del receptor; y 3) expresa endógenamente la chaperona RIC-3, lo cual condiciona y favorece la expresión del α_7 nAChR.

La Figura 26A muestra las imágenes confocales de las células expresando α_7 -HA o dup α_7 -myc, marcando simultáneamente la membrana con WGA. El inmunomarcaje de las subunidades nicotínicas se realizó con los anticuerpos primarios anti-HA o anti-c-myc (ver Tabla 5) y los correspondientes anticuerpos secundarios realizados en cabra recogidos en la Tabla 6 [anti-conejo IgG conjugado con Alexa Fluor 555 (rojo) y anti-ratón IgG conjugado con Alexa Fluor 488 (verde)]. Se observa que, aunque ambas subunidades nicotínicas son eficientemente expresadas en este tipo celular, el rendimiento de la transfección es ligeramente superior para α_7 que para dup α_7 ($17 \pm 2\%$ vs. $12 \pm 2\%$ de células positivas). La Figura 26B muestra el barrido de intensidad de fluorescencia a lo largo del eje X realizado en dos células típicas expresando α_7 -HA o dup α_7 -myc; dicha fluorescencia corresponde al marcate de membrana con WGA (azul) junto al inmunomarcaje de α_7 (rojo) o de dup α_7 (verde). Se aprecia que α_7 tiene un alto grado de superposición con la membrana, mientras que dup α_7 parece localizarse preferentemente a nivel submembranal y citosólico. Estos resultados sobre distribución celular de ambas subunidades nicotínicas son corroborados cuando se utiliza la función de colocalización de Leica en células expresando α_7 -HA o dup α_7 -myc inmunomarcadas para una u otra subunidad, como se acaba de describir, a la vez que se identifica la membrana con WGA (Fig. 26C). Como se aprecia en la figura,

esta función de colocalización transforma en puntos blancos todos los sitios en los que α_7 -HA o dup α_7 -myc coinciden con la membrana celular. Puede apreciarse una elevada densidad de sitios de colocalización en membrana en el caso de α_7 frente a la casi ausencia de estos sitios cuando es dup α_7 la única subunidad expresada.

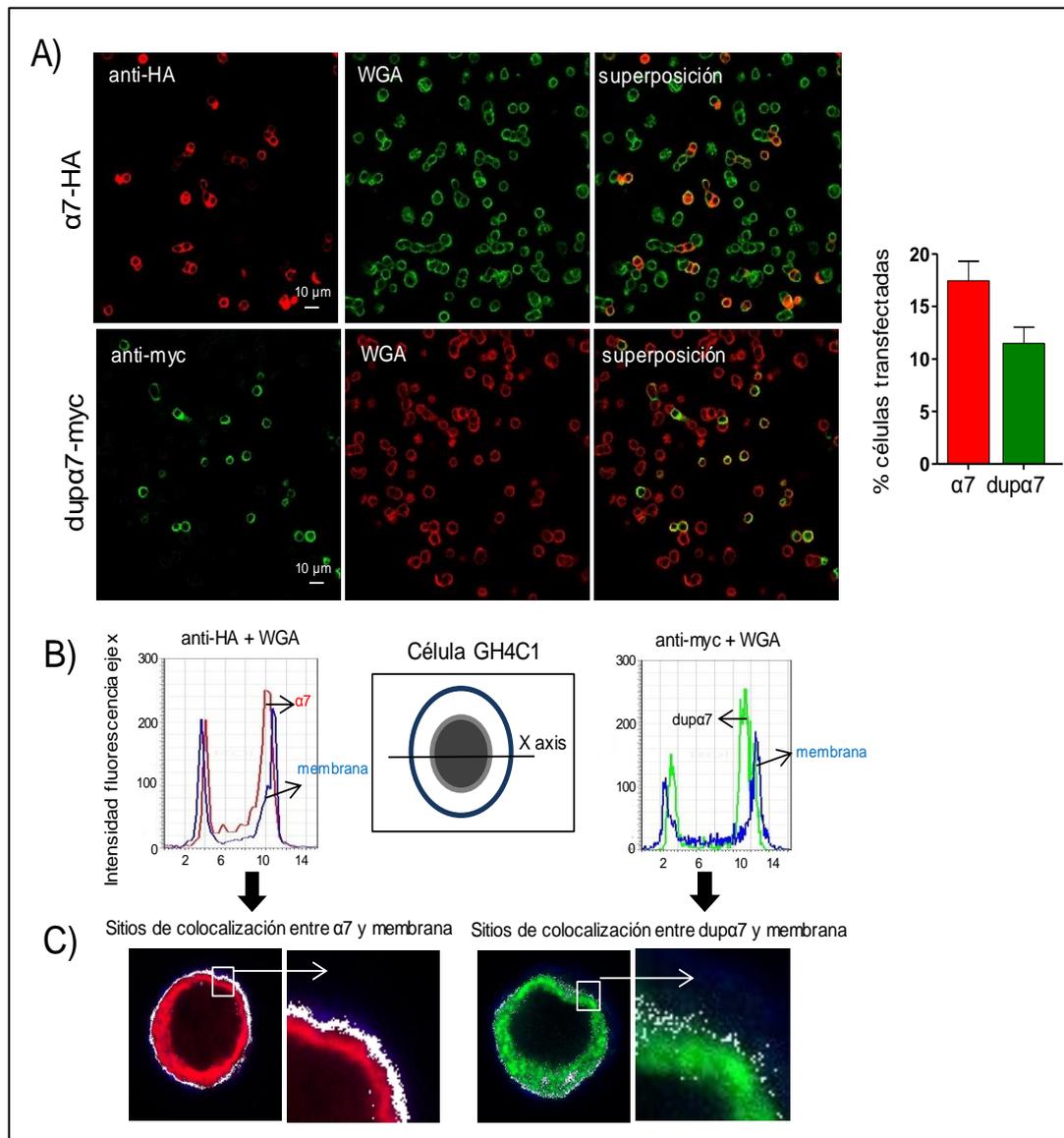


Figura 26.- Expresión de los plásmidos α_7 -HA.pDNA3.1 o dup α_7 .pcDNA3.1myc-His en células GH4C1. A) Imágenes confocales representativas de células expresando α_7 -HA (rojo) o dup α_7 -myc (verde) tras el inmunomarcaje de los respectivos epítomos. El marcate de la membrana con WGA se visualizó con un color distinto al utilizado para marcar α_7 -HA o dup α_7 -myc. A la derecha, un diagrama con el porcentaje de células positivas para cada subunidad tras la transfección. B) Intensidad de fluorescencia correspondiente a α_7 y membrana, o a dup α_7 y membrana a lo largo del eje X en dos células expresando una u otra subunidad. C) Imagen de microscopía confocal utilizando la función de colocalización de Leica, mostrando los sitios de colocalización (píxeles blancos) de α_7 -HA o de dup α_7 -myc con la membrana celular en dos células que expresan una u otra proteína. La imagen a la derecha de cada célula muestra una ampliación de la zona enmarcada en la imagen izquierda.

3 ANÁLISIS DE LA COLOCALIZACIÓN DE α_7 -HA Y $\text{dup}\alpha_7$ -myc EN CÉLULAS GH4C1 COTRANSFECTADAS CON AMBAS SUBUNIDADES NICOTÍNICAS.

Una vez comprobado que las construcciones conteniendo α_7 -HA y $\text{dup}\alpha_7$ -myc son eficientemente expresadas, de forma individualizada, en la línea celular GH4C1, se procedió a coexpresar ambas construcciones (relación 1:1) en esta misma línea celular con objeto de analizar si existe algún tipo de interacción entre estas dos subunidades nicotínicas. Para realizar este análisis se utilizó un doble abordaje experimental que incluía experimentos de inmunohistoquímica y microscopía confocal, así como experimentos de co-inmunoprecipitación. Tras cotransfectar las células con las construcciones α_7 -HA.pcDNA3.1 y $\text{dup}\alpha_7$.pcDNA3.1/myc-His utilizando Lipofectamina 2000, se realizó el doble inmunomarcaje de α_7 -HA (rojo) y $\text{dup}\alpha_7$ -myc (verde) como se acaba de describir en el apartado anterior. La Figura 27A muestra las imágenes confocales obtenidas en donde se observa claramente la colocalización de α_7 y $\text{dup}\alpha_7$ (amarillo) en todas las células que expresan simultáneamente ambas proteínas.

Para conocer si la anterior colocalización respondía a una interacción física entre ambas subunidades se procedió a realizar experimentos de co-inmunoprecipitación. Para ello se utilizaron los lisados de células GH4C1 cotransfectadas con las dos construcciones anteriores, así como los lisados de células transfectadas solo con $\text{dup}\alpha_7$.pcDNA3.1/myc-His. En estos experimentos se utilizó el anticuerpo anti-c-myc para inmunoprecipitar y los anticuerpos anti-HA y anti-c-myc (Tabla 5) para posteriormente identificar en el inmunoblot las bandas correspondientes a las subunidades α_7 y $\text{dup}\alpha_7$ disociadas de las bolas magnéticas. También se utilizaron los anticuerpos anti-HA y anti-c-myc en el lisado celular sin inmunoprecipitar para confirmar en el inmunoblot que el tamaño de ambas proteínas correspondía al esperado, como así fue el caso (Figura 27B). Así, las bandas de α_7 o $\text{dup}\alpha_7$ tenían un tamaño de 56 kDa y 41 kDa respectivamente, resultado que está de acuerdo con las predicciones realizadas según la secuencia peptídica disponible en la página web del National Center for Biotechnology Information NCBI, EEUU (números de acceso 746.5 y 139320.1, respectivamente). La Figura 27B también muestra que en las células cotransfectadas con ambas proteínas, la inmunoprecipitación de $\text{dup}\alpha_7$ con anti-c-myc arrastra consigo a la

subunidad α_7 , lo cual indica que ambas proteínas están físicamente asociadas cuando son coexpresadas.

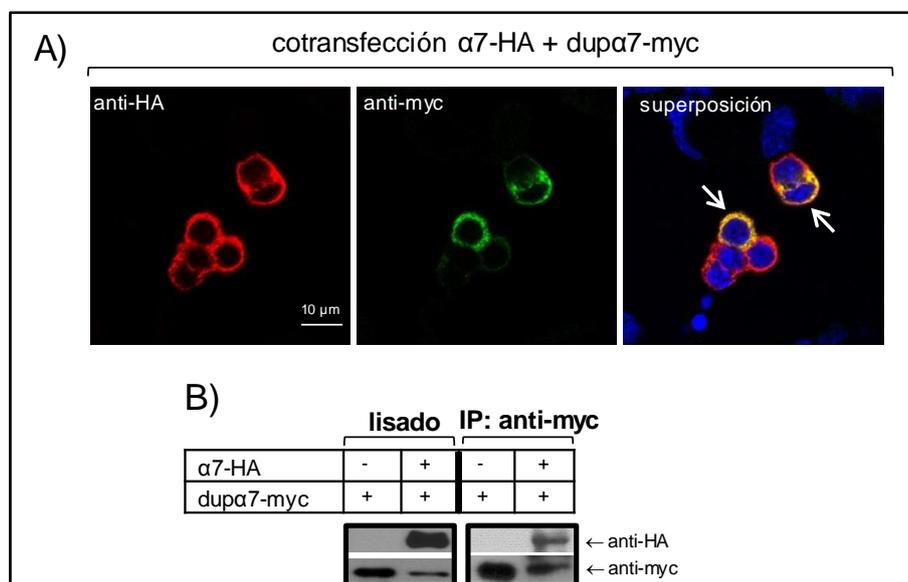


Figura 27.- Interacción de α_7 y dup α_7 en células GH4C1 coexpresando ambas subunidades. A) Imágenes confocales mostrando la colocalización (amarillo) de α_7 -HA (rojo) y dup α_7 -myc (verde) en células que coexpresan ambas proteínas (señaladas con flechas, en amarillo). B) Inmunoblots realizados en el lisado celular o tras la inmunoprecipitación con anti-c-myc en células trasfectadas con dup α_7 .pcDNA3.1/myc-His o doblemente transfectadas con α_7 -HA.pcDNA3.1 y dup α_7 .pcDNA3.1/myc-His. Los anticuerpos anti-HA o anti-c-myc fueron utilizados para identificar una u otra proteína en el inmunoblot.

4 LA SUBUNIDAD dup α_7 SE ENSAMBLA CON SUBUNIDADES α_7 FORMANDO RECEPTORES HÍBRIDOS EN LA MEMBRANA DE CÉLULAS GH4C1.

Las células GH4C1 fueron cotransfectadas con las construcciones α_7 .pmaxGFP y dup α_7 .pmCherry (proporción 1:0,5 o 1:1) con objeto de analizar la interacción entre ambas subunidades nicotínicas mediante FRET utilizando la técnica del fotoblanqueo del aceptor, tal como ha sido descrito en la sección de Materiales y Métodos. La Figura 28 recoge los resultados obtenidos. Los paneles A y B de la figura muestran la fluorescencia de emisión, tanto del donador (α_7 -GFP) como del aceptor (dup α_7 -Cherry) antes y después del fotoblanqueo del aceptor en el área recuadrada, donde se detecta un incremento de la emisión de fluorescencia de α_7 -GFP. La eficiencia de FRET para la combinación (1:0,5) de α_7 -GFP:dup α_7 -Cherry fue de $12,7 \pm 1,4$ % (Fig. 28C); dicho valor se incrementó significativamente ($22,7 \pm 1,7$ %) cuando se incrementaba la

proporción de $\text{dup}\alpha_7$ en la combinación de plásmidos transfectados (α_7 -GFP: $\text{dup}\alpha_7$ -Cherry, 1:1).

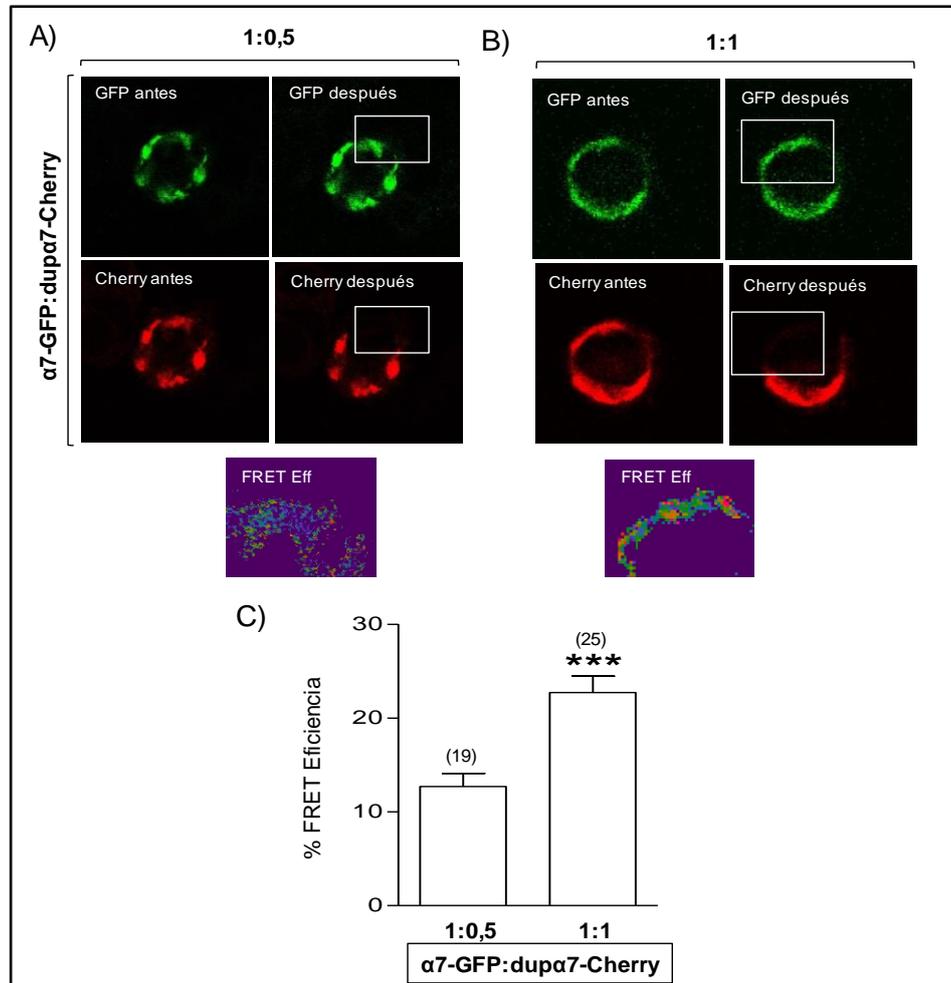


Figura 28.-Interacción física entre las subunidades $\text{dup}\alpha_7$ y α_7 en la membrana celular analizada por FRET. A) Imagen representativa de una célula cotransfectada con α_7 -GFP y $\text{dup}\alpha_7$ -Cherry en la proporción 1:0,5. B) Imagen representativa de una célula doblemente transfectada con ambas construcciones en una proporción 1:1. La zona señalada por el rectángulo indica la región estudiada. En la parte inferior de ambos paneles se muestran las imágenes pseudocolor representativas de la eficiencia de FRET, en donde el color azul indica eficiencia cero mientras que el color rojo indica máxima eficiencia. El análisis de FRET revela sitios de colocalización de ambas subunidades nicotínicas en la membrana celular. C) Análisis cuantitativo de la eficiencias de FRET obtenida en ambas condiciones experimentales; entre paréntesis el número de células analizadas en cada caso.

5 LA INTERACCIÓN DE $\text{dup}\alpha_7$ Y α_7 EN CÉLULAS GH4C1 MODIFICA, EN SENTIDO OPUESTO, LA INCORPORACIÓN A MEMBRANA DE UNA Y OTRA SUBUNIDAD NICOTINICA.

Una vez constatado que las dos subunidades nicotínicas interaccionan físicamente entre sí en células GH4C1, se utilizó este tipo celular para analizar las consecuencias que dicha interacción ejercía sobre cada subunidad. Así, se analizó si $\text{dup}\alpha_7$ ejercía su efecto dominante negativo sobre α_7 nAChR por interferir con el tráfico de estos receptores hacia la membrana celular. De igual forma, se evaluó lo inverso, esto es si α_7 modificaba la movilización de $\text{dup}\alpha_7$ hacia la membrana celular. Para ello, las células fueron transfectadas con las construcciones α_7 -HA.pcDNA3.1 y $\text{dup}\alpha_7$.pcDNA3.1/myc-His de forma separada, o bien cotransfectadas con ambas construcciones, para lo cual se utilizó en todos los casos Lipofectamina 2000. Posteriormente se analizó, mediante citometría de flujo, la expresión en membrana de α_7 -HA y $\text{dup}\alpha_7$ -myc en las diferentes condiciones experimentales. Puesto que HA- y myc- están localizados en los extremos C-terminal de las dos construcciones transfectadas, ambos epítomos son extracelulares y, por tanto, no es necesaria la permeabilización celular. El marcaje de ambos epítomos se realizó con los anticuerpos primarios anti-HA y anti-c-myc y los correspondientes anticuerpos secundarios indicados previamente.

Las Figuras 29A y 29B (parte superior) muestran los histogramas originales de citometría de flujo obtenidos en células expresando α_7 o $\text{dup}\alpha_7$ de forma separada, junto con aquellos otros obtenidos cuando se coexpresan ambas subunidades en las proporciones de α_7 : $\text{dup}\alpha_7$ o $\text{dup}\alpha_7$: α_7 indicadas. En todos los casos, se mantuvo constante la cantidad de plásmido α_7 -HA transfectado. La parte inferior de ambas figuras muestra los diagramas de barras mostrando el porcentaje de células que expresan α_7 o $\text{dup}\alpha_7$ en la membrana bajo cada condición experimental. Los resultados muestran que la coexpresión de $\text{dup}\alpha_7$ junto a α_7 , particularmente cuando se cotransfecta el doble de $\text{dup}\alpha_7$ (α_7 : $\text{dup}\alpha_7$, 1:2), reduce tanto el número de α_7 nAChRs expresados en membrana (desplazamiento a la izquierda de la línea gruesa del cromatograma), como el número de células que expresan estos receptores (diagrama de barras, Fig. 29A). Un resultado totalmente opuesto fue el obtenido cuando se analiza la expresión individual de $\text{dup}\alpha_7$ frente a su expresión en células cotransfectadas con α_7 ; mientras que $\text{dup}\alpha_7$,

por sí solo, es prácticamente incapaz de movilizarse hacia la membrana celular, la coexpresión de α_7 favorece claramente su movilización hacia esta estructura celular; más aún, en presencia de α_7 , el número de subunidades $\text{dup}\alpha_7$ que llegan a membrana así como el número de células que expresan esta subunidad nicotínica es tanto mayor cuanto mayor la proporción de $\text{dup}\alpha_7$ en la mezcla de plásmidos trasfectada (Fig. 29B).

La Figura 29C muestra las imágenes confocales de un grupo de células GH4C1 cotransfectadas con las construcciones de α_7 -HA: $\text{dup}\alpha_7$ -myc (proporción 1:2) e inmunomarcadas con los correspondientes anticuerpos para identificar ambos epítomos referidos con anterioridad [α_7 -HA (rojo) o $\text{dup}\alpha_7$ -myc (verde)], utilizando WGA como marcador de la membrana celular (azul). De las cuatro células mostradas en la fila superior de la figura, una de ellas (célula #1) expresa α_7 mientras que otra (célula #2) coexpresa ambas subunidades nicotínicas, tal como se aprecia en la superposición de imágenes mostrada en la fila inferior. Cuando se realiza una amplificación de la célula #2 es posible identificar puntos blancos en la superficie celular debido a la colocalización de subunidades α_7 y $\text{dup}\alpha_7$ en membrana. Este resultado parece indicar que, en células que coexpresan α_7 y $\text{dup}\alpha_7$, se puede producir el ensamblaje de ambas subunidades nicotínicas en el RE dando lugar a un receptor mixto capaz de migrar a la membrana celular.

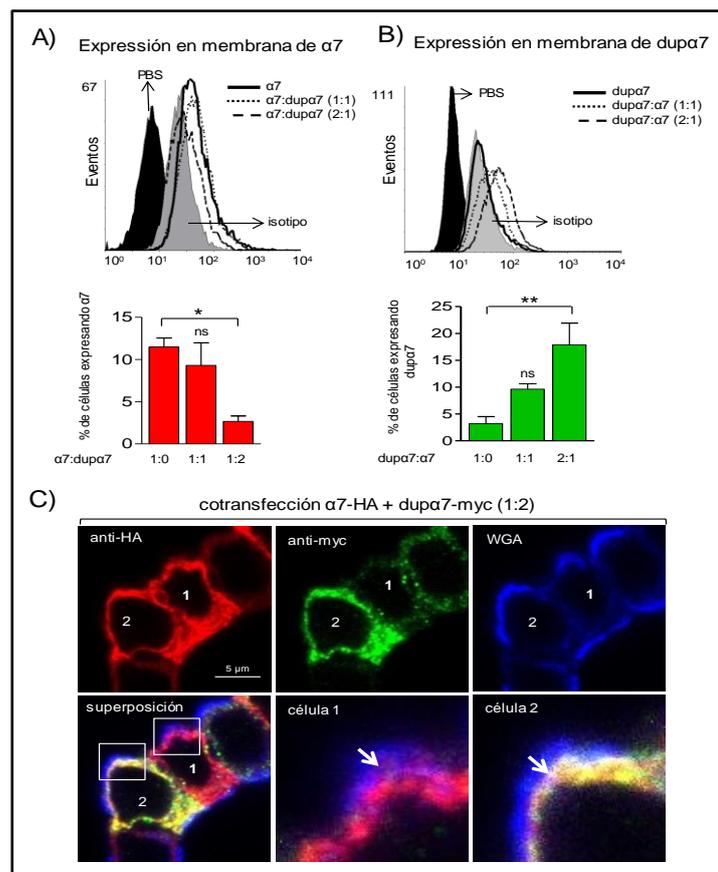


Figura 29.- La interacción entre α_7 y dupa $_7$ en células GH4C1 modifica, en sentido opuesto, la incorporación a membrana de cada subunidad nicotínica. Análisis de la expresión en la membrana celular de α_7 (A) o dupa $_7$ (B) realizado por citometría de flujo en células transfectadas con la construcción α_7 -HA o dupa $_7$ -myc, o bien cotransfectadas con ambas construcciones; los histogramas son representativos de 4 experimentos independientes. C) Imágenes confocales obtenidas en células cotransfectadas con las construcciones de α_7 -HA y dupa $_7$ -myc, tras el correspondiente inmunomarcaje para visualizar la expresión de α_7 -HA (rojo) y/o de dupa $_7$ -myc (verde); se utilizó WGA para el marcaje de la membrana (azul). Mientras la célula #1 solo expresa α_7 , la célula #2 coexpresa ambas subunidades nicotínicas. Las imágenes amplificadas de ambas células permiten identificar los sitios de colocalización señalados por las flechas; en la célula #1 se aprecia la llegada a membrana del α_7 nAChR (violeta), mientras que en la célula #2 se observa la colocalización de α_7 y dupa $_7$ en la membrana (blanco).

6 LAS SUBUNIDADES α_7 Y $\text{dup}\alpha_7$ SE ENSAMBLAN ANÓMALAMENTE EN EL RE DE LAS CÉLULAS HEK293.

Aunque las células GH4C1 son un magnífico modelo para analizar la expresión de subunidades nicotínicas en la membrana celular, esta línea celular posee un núcleo muy grande y un citosol tan pequeño que hace imposible estudiar la existencia de una posible colocalización de α_7 y $\text{dup}\alpha_7$ en RE, donde estas subunidades podrían constituir receptores mixtos bien conformados o deficientemente ensamblados. En el primer caso, el receptor sería capaz de migrar hacia la membrana celular; en el segundo caso, las subunidades nicotínicas se acumularán en el RE. Para sortear la limitación de las células GH4C1, se recurrió a analizar la expresión de α_7 -HA y $\text{dup}\alpha_7$ -myc en el RE de células HEK293, una línea celular ampliamente utilizada en estudios de expresión heteróloga de proteínas. Debido a que esta última línea celular no expresa endógenamente la chaperona RIC-3, necesaria para ensamblar correctamente subunidades nicotínicas que den lugar a receptores nicotínicos funcionales (Lee y col., 2009; Murkheyee y col., 2009), las células fueron sometidas a una triple transfección con las construcciones α_7 -HA.pcDNA3.1, $\text{dup}\alpha_7$.pcDNA3.1/myc-His y h-RIC-3.pcDNA (proporción 1:1:1).

La Figura 30 muestra los resultados de estos experimentos de triple transfección en células HEK293 inmunomarcadas para reconocer las subunidades α_7 -HA y $\text{dup}\alpha_7$ -myc, tal como ha sido descrito previamente. En estas mismas células, se procedió al marcaje simultáneo del RE [anticuerpo primario anti-calnexina y el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa Fluor 647 realizado en cabra (azul)], o de la membrana plasmática [con WGA conjugada con Alexa Fluor 647 (azul)]. Los resultados muestran que las subunidades α_7 y $\text{dup}\alpha_7$ se colocalizan casi exclusivamente en RE, probablemente formando receptores mal ensamblados incapaces de migrar a la membrana celular, donde no se observa la llegada de ninguna de las subunidades nicotínicas (Fig. 30B).

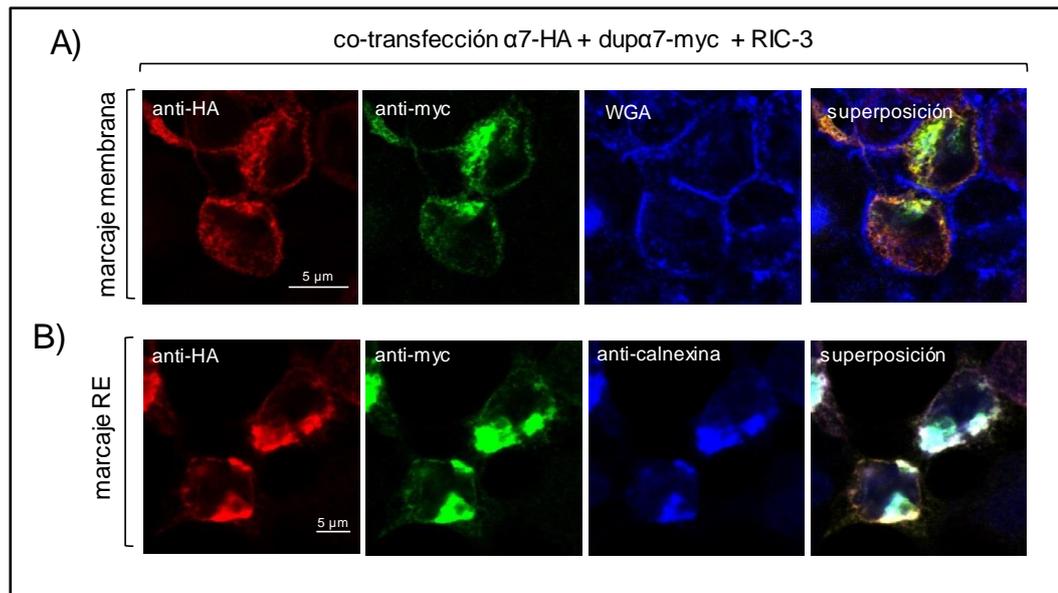


Figura 30.- Colocalización de subunidades α_7 y dup α_7 en el RE de células HEK293. Las células fueron sometidas a una triple transfección para expresar las dos subunidades nicotínicas y la chaperona RIC-3. A) En la fila superior se muestra las imágenes confocales correspondientes a dos células marcadas para α_7 -HA (rojo), dup α_7 -myc (verde) y membrana (WGA, azul), así como la superposición de las tres imágenes. B) La fila inferior corresponde a las imágenes confocales de dos células inmunomarcadas para α_7 -HA (rojo), dup α_7 -myc (verde) y RE (calnexina, azul), así como la superposición de éstas imágenes. Las dos subunidades nicotínicas permanecen colocalizadas en el RE sin migrar hacia la membrana celular.

7 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN ENDÓGENA DE α_7 Y FORÁNEA DE dup α_7 EN LA LÍNEA CELULAR RAW264.7.

Una vez probado que dup α_7 interacciona físicamente con la subunidad nicotínica α_7 en células GH4C1, lo cual conduce a una reducción de la expresión del α_7 nAChR en la membrana celular, nos propusimos investigar si dicha interacción tiene una traducción funcional en células de mamíferos. Entre las diversas funciones atribuidas al α_7 nAChR, una de las más interesantes es aquella relacionada con el control de la inflamación. Así, existen numerosos estudios demostrando como la activación por nicotina del α_7 nAChR de células inmunes interfiere con la activación de NF- κ B y, consecuentemente, reduce la producción de citoquinas proinflamatorias en estas células (Wang y col., 2003; Wang y col., 2004; de Jonge 2005; The y col., 2007).

En base a lo anterior, fueron diseñados una serie de experimentos en células RAW264.7 para evaluar si dup α_7 era capaz de interferir con el efecto anti-inflamatorio mediado por el α_7 nAChR. Esta línea celular de macrófagos de rata es un excelente modelo para evaluar mecanismos implicados en la inflamación ya que expresa

endógenamente el α_7 nAChR cuya estimulación por nicotina interfiere con la activación de NF- κ B y la producción de citoquinas proinflamatorias inducida por LPS (Wang y col., 2004). Sin embargo, antes de iniciar los experimentos funcionales, quisimos evaluar cómo era la expresión endógena de α_7 en este tipo celular, y también si estas células eran o no capaces de expresar foráneamente la subunidad dup α_7 , proteína que solo se expresa nativamente en células humanas.

La Figura 31A muestra las imágenes confocales obtenidas en células RAW264.7 inmunomarcadas para la subunidad α_7 endógena (verde) utilizando el anticuerpo primario mab306 y el anticuerpo secundario anti-ratón IgG Alexa Fluor 488 realizado en cabra (Tablas 5 y 6). La Figura 31B muestra las imágenes confocales de esta mismo tipo celular nucleofectado con dup α_7 .pcDNA3.1/myc-His, en donde la expresión foránea de la subunidad dup α_7 (verde) es detectada con el anticuerpo anti-myc y el correspondiente anticuerpo secundario indicado en apartados anteriores. En ambos casos, el núcleo fue identificado con DAPI. Los resultados muestran que ambas subunidades, endógena y foránea, presentan un aceptable nivel de expresión en este tipo celular.

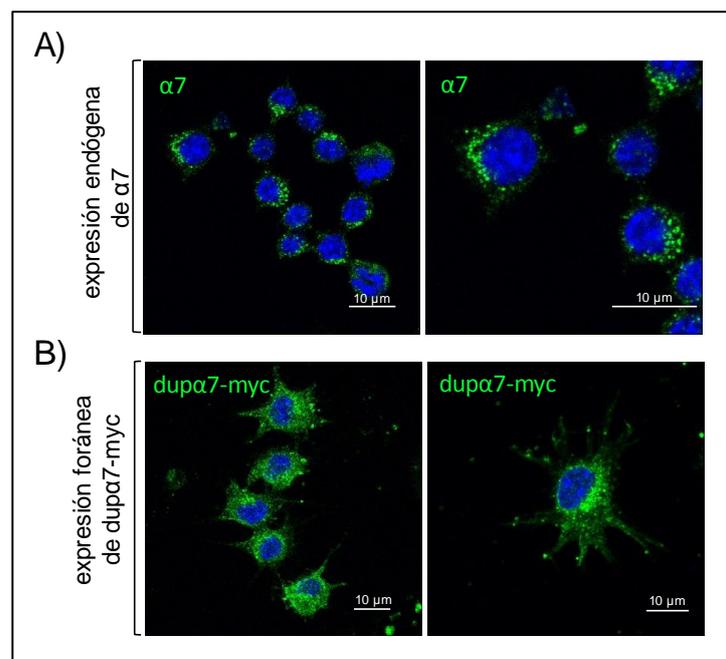


Figura 31.- Expresión endógena de α_7 y exógena de dup α_7 en células RAW264.7. A) Imágenes confocales de células RAW264.7 tras el inmunomarcaje de la subunidad α_7 endógena (verde). B) Células nucleofectadas con la construcción dup α_7 -myc, tras la inmunotinción del dup α_7 (verde). En ambos casos se procedió al marcaje del núcleo con DAPI (azul).

8 TRADUCCIÓN FUNCIONAL DE LA INTERACCIÓN α_7 Y dup α_7 A NIVEL DE LA INFLAMACIÓN EN CELULAS RAW264.7.

Una vez constatada la expresión endógena de α_7 , así como la eficiencia de la nucleofección para expresar la proteína foránea dup α_7 en células RAW264.7, se diseñaron una serie de experimentos enfocados a analizar cómo la expresión de dup α_7 afectaba al efecto antiinflamatorio de nicotina mediado por el α_7 nAChR. Como indicador de dicho efecto antiinflamatorio se midió la activación de NF- κ B y la producción de la citoquina proinflamatoria TNF- α inducidas por LPS. Para medir el grado de activación del factor de transcripción, las células fueron inmunomarcadas con los anticuerpos anti-NF- κ B y anti-conejo IgG Alexa Fluor 555 realizado en cabra (Tablas 5 y 6) para reconocer el NF- κ B (rojo), marcando el núcleo con DAPI (azul), y visualizando el resultado por microscopía confocal (Fig. 32). El grado de activación del NF- κ B en cada condición experimental se valoró de acuerdo a su traslocación desde el citosol al núcleo. Las tres filas superiores de la figura muestra la localización subcelular del NF- κ B en células sin nucleofectar, en condiciones controles, tras la estimulación con LPS (100 ng/ml, 1 h), o tras la incubación con 10 μ M de nicotina 30 minutos antes y durante la estimulación con LPS. Se puede apreciar como el NF- κ B permanece retenido en el citosol en condiciones controles, su activación por traslocación al núcleo en respuesta al LPS, y como nicotina previene el efecto de LPS.

Las dos filas inferiores de la Figura 32 muestran células nucleofectadas con la construcción de dup α_7 -myc o con el mismo vector de esta construcción-myc, pero sin la región codificante para la subunidad dup α_7 (vector vacío); el éxito de la nucleofección en ambos casos se constata por el color verde de las imágenes confocales del centro y derecha tras realizar la inmunotinción para -myc- con los anticuerpos mencionados previamente. En ambos casos, las células fueron estimuladas con nicotina y LPS, como se acaba de describir. Se observa como la expresión del vector vacío no altera el efecto de nicotina sobre la activación de NF- κ B inducida por LPS, mientras que la expresión de dup α_7 revierte casi por completo el efecto de nicotina, por lo que nuevamente se obtiene la translocación al núcleo del NF- κ B en respuesta a LPS.

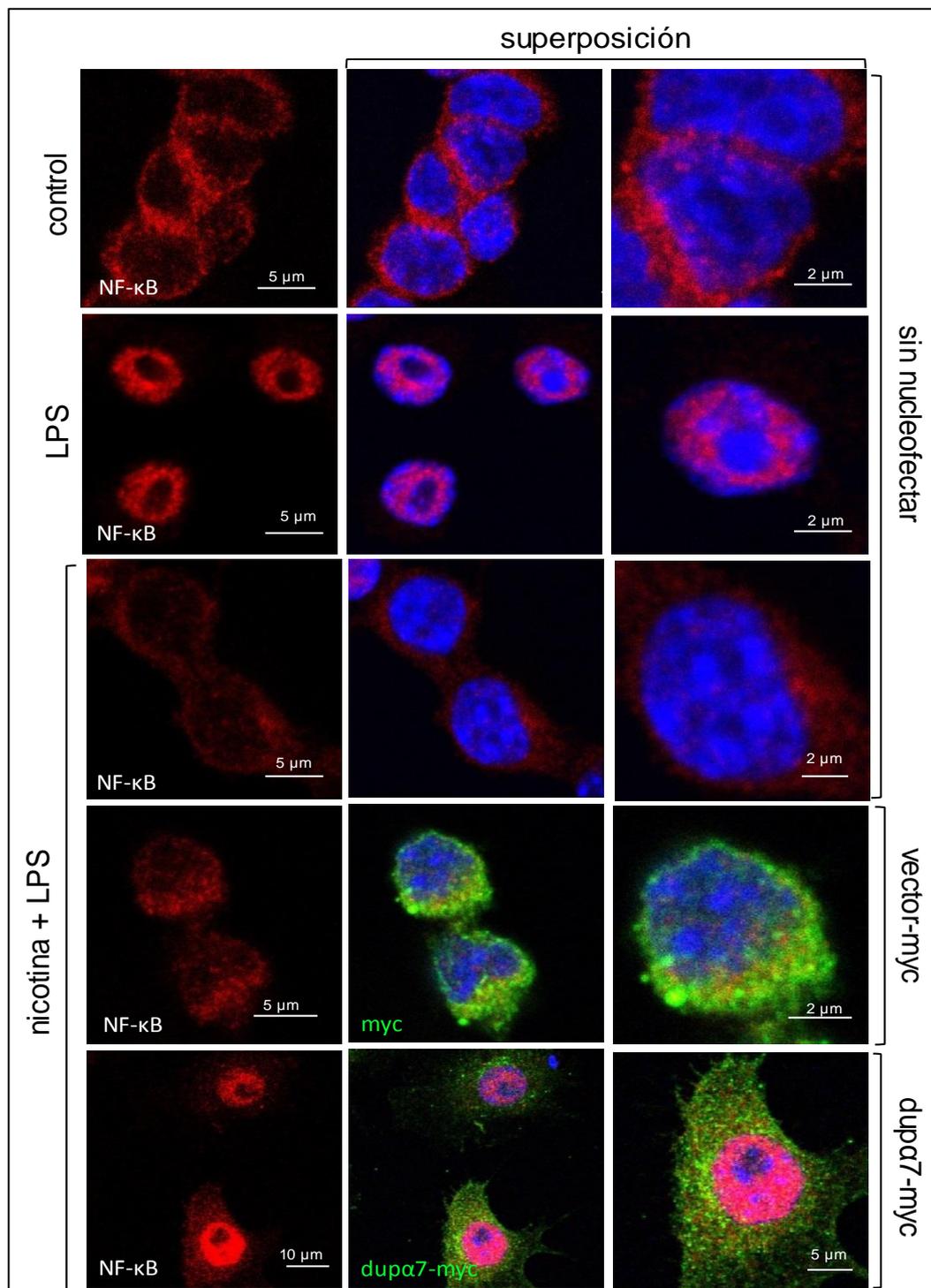


Figura 32.- Nicotina previene la activación de NF-κB-p65 inducida por LPS, mientras que dupα₇ revierte el efecto de nicotina en células RW264.7. Las imágenes muestran el marcaje de NF-κB-p65 (rojo), del núcleo (azul) o del epítipo -myc- (verde) en el caso de las células nucleofectadas con dupα₇-myc o con el vector-myc vacío. En células no nucleofectadas, se aprecia como LPS (100 ng/ml) induce la translocación al núcleo de NF-κB, efecto que es revertido por el pretratamiento con nicotina (10 μM). El efecto de nicotina es prevenido en células nucleofectadas con dupα₇-myc pero no en células nucleofectadas con el vector-myc vacío.

Una vez constatado que dup α_7 interfiere con el efecto antiinflamatorio de nicotina a nivel de la activación de NF- κ B, procedimos a evaluar si dicha interferencia se producía o no a nivel transcripcional. Con el fin de explorar esta última hipótesis, se procedió a la transfección transitoria de las células RAW264.7 con los plásmidos reporteros pNF- κ B-LUC y pTK-RL, utilizando Lipofectamina 2000. Las características de estos plásmidos y las bases del ensayo del gen reportero de luciferasa han sido convenientemente especificadas en la sección de “Materiales y Métodos”. Las células fueron sometidas a los distintos tratamientos 24 h post-transfección, expresando los resultados de la luminiscencia generada por la luciferasa como porcentaje de actividad frente al control en células no estimuladas. Los resultados muestran como la incubación con LPS (100 ng.ml⁻¹; 4 h) activa la transcripción de NF- κ B, y como el pre-tratamiento con nicotina (10 μ M; 30 minutos antes y durante LPS) previene parcial pero significativamente dicha activación (Fig. 33A). Más aún, la transfección de dup α_7 -myc revierte parcialmente el efecto de nicotina. También cabe mencionar que nicotina por si sola es capaz de reducir la transactivación de NF- κ B.

Seguidamente se analizó el efecto de dup α_7 a nivel de la producción de la citoquina proinflamatoria TNF- α en células RAW264.7 sometidas a los anteriores tratamientos. Los resultados muestran que LPS produce un incremento significativo de TNF- α , tanto en células nucleofectadas con el vector-myc vacío como en células nucleofectadas con dup α_7 -myc (Figs. 33B y 33C). Sin embargo, mientras que la preincubación con nicotina bloquea de forma contundente y significativa el efecto de TNF- α en el primer caso, no ocurre así en las células nucleofectadas con dup α_7 . Esto es, la nucleofección de dup α_7 previene el efecto antiinflamatorio de nicotina sobre la producción de TNF- α inducida por LPS.

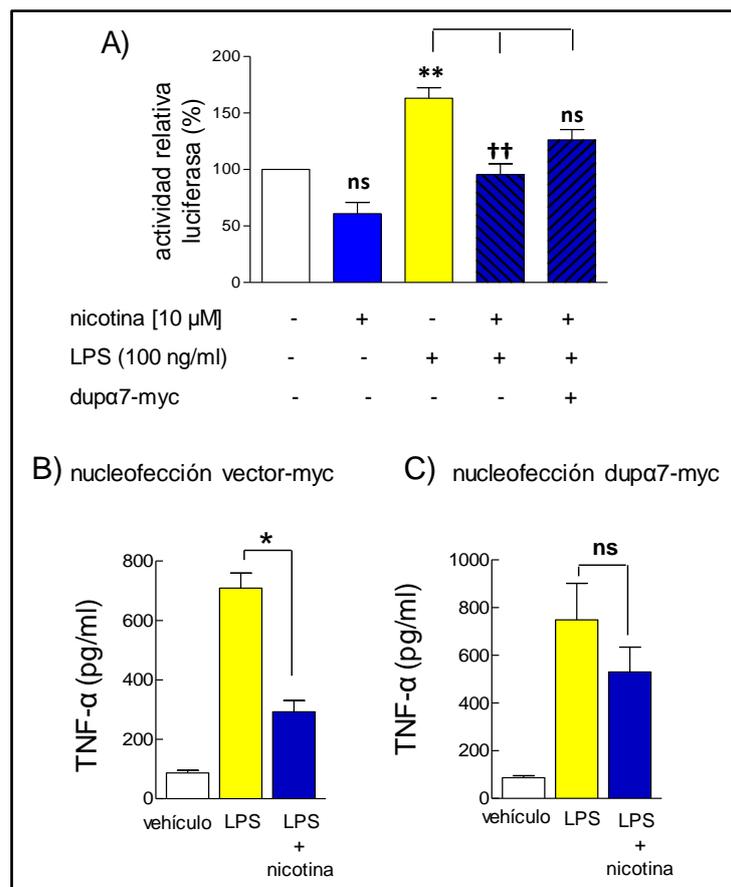


Figura 33 .- La expresión de dup α 7 revierte parcialmente el efecto antiinflamatorio de nicotina a nivel de NF- κ B y de la producción de TNF- α en células RAW264.7. A) Las células fueron transfectadas con el gen reportero de luciferasa conteniendo la región de reconocimiento de NF- κ B. Algunas de estas células fueron también transfectadas con la construcción dup α 7-myc. Veinticuatro horas más tarde, se ensayó la actividad transcripcional de NF- κ B por luminiscencia en células pre-tratadas o no con nicotina 30 minutos antes y durante la estimulación de LPS (100 ng.ml⁻¹; 4 h). B) Las células fueron nucleofectadas con el vector-myc vacío o con dup α 7-myc, e incubadas con LPS, con o sin pre-tratamiento con nicotina. Posteriormente, utilizando técnicas de ELISA, se determinó en el sobrenadante celular la liberación de TNF- α generada por las distintas condiciones experimentales.

9 LA EXPOSICIÓN PROLONGADA A NICOTINA INCREMENTA LA EXPRESIÓN DE IRAK-M EN MØ HUMANOS.

Ha sido demostrado previamente que nicotina reduce la producción de citoquinas pro-inflamatorias inducida por LPS en macrófagos, y también que IRAK-M regula negativamente la respuesta inmune innata mediada por TLR-IL-1R en el mismo tipo celular. Con objeto de evaluar si existe alguna relación entre nicotina y el regulador negativo de la inflamación, decidimos investigar si la incubación con nicotina de los MØ humanos modificaba la expresión de IRAK-M, tanto a nivel de proteína como del ARNm. Los resultados muestran que nicotina (10 μ M, 24 h) incrementa significativamente los niveles de la proteína IRAK-M respecto a células del mismo cultivo no estimuladas (Fig. 34A). De hecho, el incremento producido (~3,5 veces) fue muy similar al inducido por LPS (100 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) incubado durante un periodo de tiempo similar.

Para conocer si el anterior efecto de nicotina se produce a nivel de transcripción génica, se realizaron experimentos de qPCR en los que se analizó el curso temporal de la expresión del ARNm de IRAK-M en MØ humanos estimulados con 10 μ M de nicotina durante diferentes periodos de tiempo (Fig. 34B). Células no estimuladas o células estimuladas con LPS (100 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, 6 h) del mismo cultivo fueron utilizadas como control negativo y positivo, respectivamente. La amplificación por PCR se realizó a partir de RNA total aislado de los cultivos de MØ humanos sometidos a los tratamientos indicados, utilizando β 2m como control interno y las dos parejas de cebadores recogidas en la Tabla 12 de la sección de “Material y Métodos”. Los resultados muestran que nicotina incrementa el nivel de ARNm de IRAK-M, con un pico de expresión a las 6 h, el cual declina posteriormente hasta llegar a valores indistinguibles de los basales a las 24 h de iniciar el tratamiento.

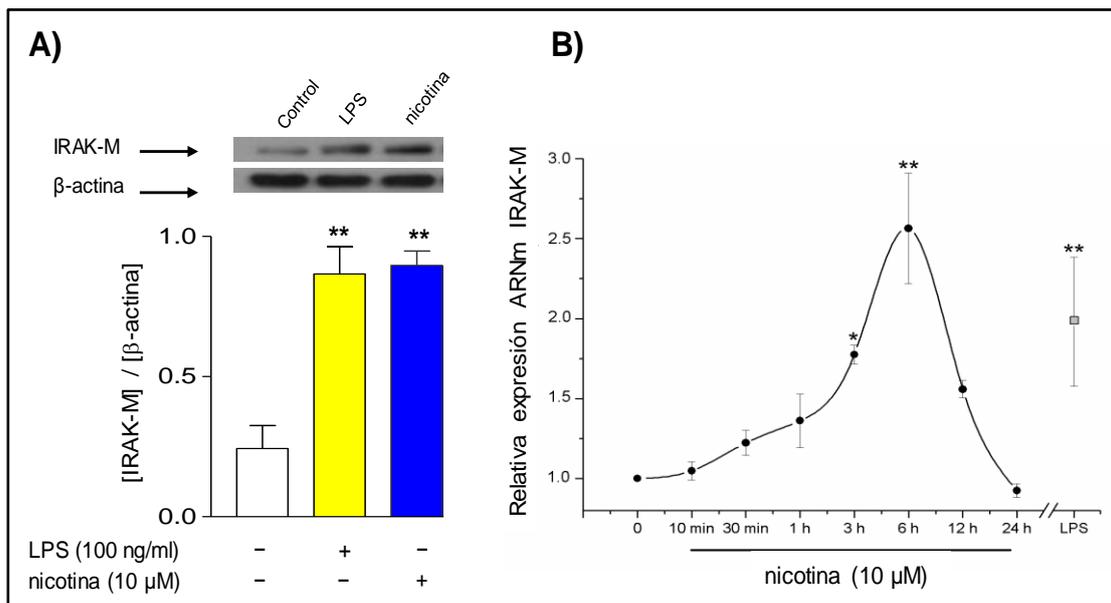


Figura 34.- Incremento de expresión de IRAK-M inducido por nicotina en macrófagos humanos (MØ). A) Análisis por western blot de los niveles de IRAK-M en MØ incubados con nicotina y/o LPS (24 h). En la parte superior se muestra un inmunoblot representativo de estos experimentos; las barras de la parte inferior representan los valores medios \pm E.E.M. de 6 cultivos diferentes. ** $p \leq 0,01$ comparando con células no estimuladas del mismo cultivo (barra blanca). B) Análisis, mediante qPCR, de la expresión génica de IRAK-M en MØ estimulados con nicotina durante los periodos de tiempo indicados; el cuadrado de la derecha representa el efecto de LPS (100 ng.ml⁻¹, 6 h). La gráfica muestra los valores medios \pm E.E.M de las veces que la expresión es incrementada por el estímulo respecto a células no estimuladas del mismo cultivo; estos valores fueron obtenidos de 5-6 cultivos diferentes; * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$.

10 EL EFECTO DE NICOTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE IRAK-M ES CONCENTRACIÓN Y TIEMPO DEPENDIENTE.

Los siguientes experimentos fueron diseñados para determinar la concentración umbral de nicotina y el curso temporal de su efecto sobre la expresión de IRAK-M en macrófagos de dos especies diferentes: MØ humanos y la línea celular de ratón RAW 264.7. La Figura 35 muestra los resultados de western blot obtenidos en los dos tipos celulares tras su incubación durante 24 h con concentraciones crecientes de nicotina. En ambos tipos de macrófagos, la concentración umbral de nicotina que produjo un aumento significativo de la expresión de IRAK-M fue de 100 nM, aumentando posteriormente la expresión de la proteína de manera paralela al incremento de la concentración del agonista nicotínico.

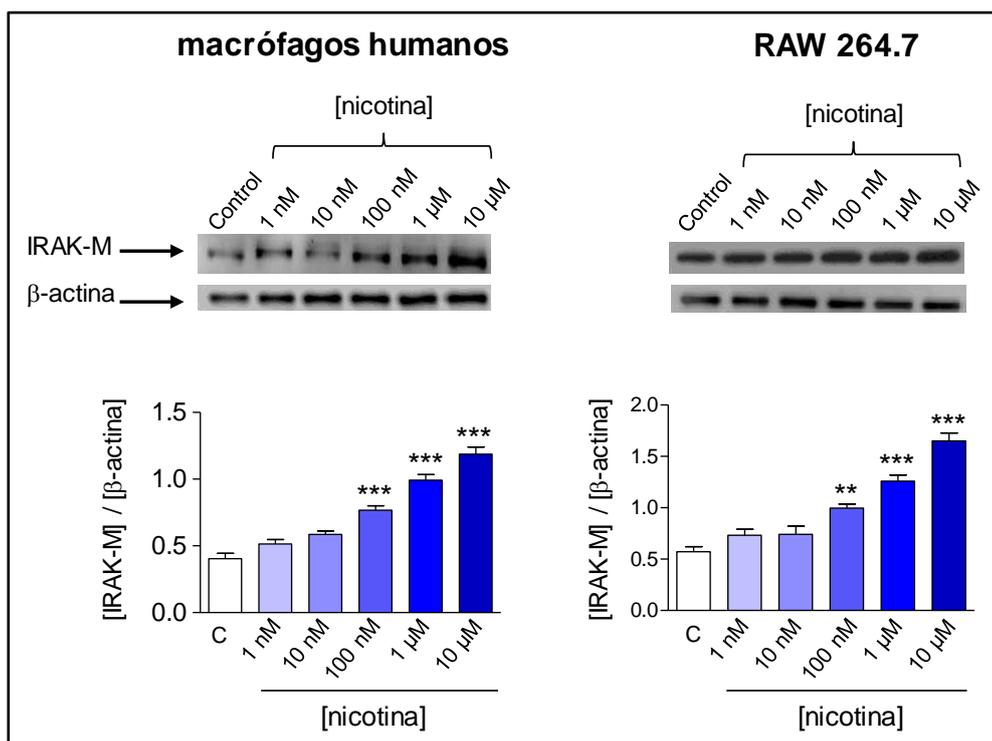


Figura 35.- Expresión de IRAK-M en macrófagos humanos y células RAW264.7 expuestas a concentraciones crecientes de nicotina. Los cultivos fueron incubados durante 24 h con la concentración de nicotina indicada, analizándose posteriormente la expresión de IRAK-M por western blot. En la parte superior se muestra un típico inmunoblot. Los diagramas de barras representan los valores medios \pm E.E.M. de 5-6 cultivos diferentes; ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$ respecto a células no estimuladas del mismo cultivo (control).

La Figura 36 analiza el efecto de nicotina (1 μ M), incubada por distintos periodos de tiempo, sobre la expresión de IRAK-M en los dos tipos de macrófagos. El tiempo de incubación con nicotina aparece indicado en la figura. Los resultados de

western blot muestran que el efecto de nicotina sobre la expresión de IRAK-M empieza a ser significativo a las 6 h, alcanza un pico a las 24 h, para declinar posteriormente. Por esta razón, un periodo de estimulación de 24 h con nicotina fue seleccionado para los experimentos que se realizaron con posterioridad.

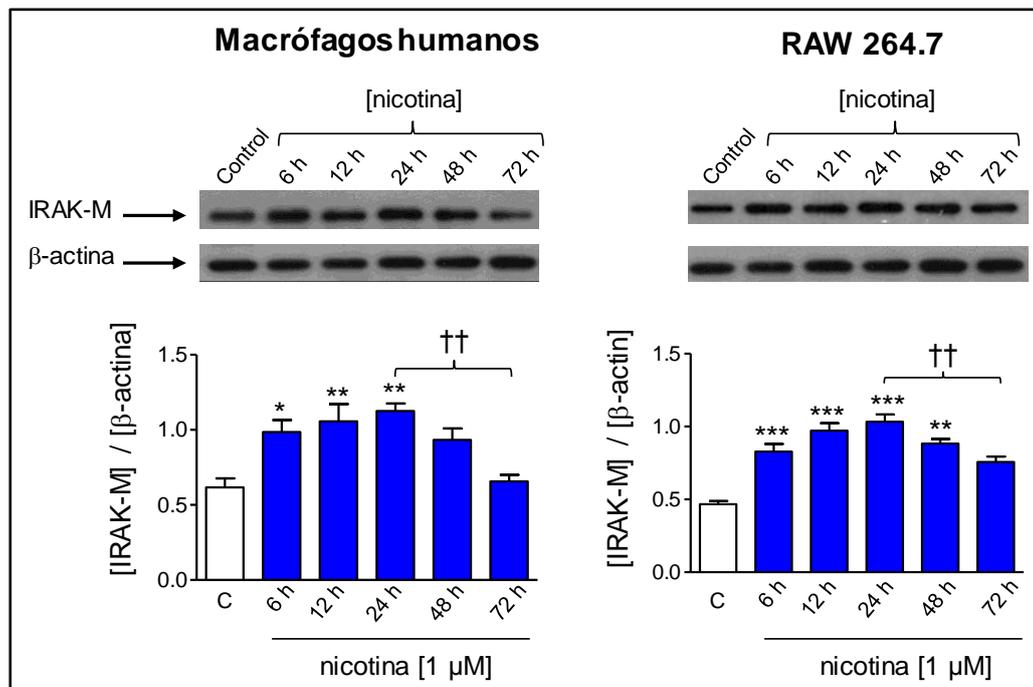


Figura 36.-Curso temporal del efecto de nicotina sobre la expresión de IRAK-M en macrófagos humanos y células RAW264.7. En todos los casos, las células fueron incubadas con 1 μ M de nicotina durante los periodos indicados. La parte superior de la figura recoge un inmunoblot representativo de cada tipo celular, mientras que los diagramas de barras muestran los valores medios \pm E.E.M. de los datos obtenidos en 5 cultivos celulares diferentes sometidos al tratamiento indicado; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$ respecto a células no estimuladas del mismo cultivo (control); †† $p \leq 0,01$ tras comparar los histogramas indicados.

11 EL RECEPTOR NICOTÍNICO DEL SUBTIPO α_7 DE MØ HUMANOS ESTÁ IMPLICADO EN EL EFECTO DE NICOTINA SOBRE IRAK-M.

El análisis por citometría de flujo de los cultivos celulares de MØ humanos, obtenidos como se ha descrito en la sección de “Materiales y Métodos”, indica que la mayoría de las células adherentes aisladas del total de buffy coats, pertenecientes a voluntarios sanos, utilizados en este estudio ($n = 50$) eran monocitos [CD14⁺ ($92,4 \pm 2,1$ %) y CD89⁺ ($93,2 \pm 2,4$ %)]. Por ello, el análisis de las células CD14⁺ marcadas con α Bgtx-FITC permite conocer el nivel de expresión del α_7 nAChR en monocitos en diferentes estados de diferenciación a macrófagos (3, 8 y 12 días). La Figura 37A muestra que la

expresión del α_7 nAChR es ya detectable desde el día 8 de diferenciación, aunque continúa incrementándose hasta los días 10-12. Por ello, todos los experimentos a los que nos referiremos a continuación fueron realizados en MØ diferenciados durante este último periodo de tiempo. La expresión del α_7 nAChR en MØ humanos fue ratificada mediante microscopía confocal practicada en células inmunomarcadas con α Bgtx-FITC, siguiendo el protocolo previamente descrito por nuestro grupo (de Lucas-Cerrillo y col., 2011). La Figura 37B muestra una imagen confocal de un cultivo típico de MØ diferenciados durante 12 días en donde se aprecia con nitidez la expresión del α_7 nAChR (verde) marcado selectivamente por la toxina conjugada al fluoróforo. Dicho marcaje es específico ya que no se observa en macrófagos del mismo cultivo preincubados con 1 μ M α Bgtx sin marcar (no mostrado) o con 500 μ M de nicotina antes de la incubación con α Bgtx-FITC (Fig.37C). La Figura 37D muestra una imagen de luz transmitida del mismo campo mostrado en la Figura 37C.

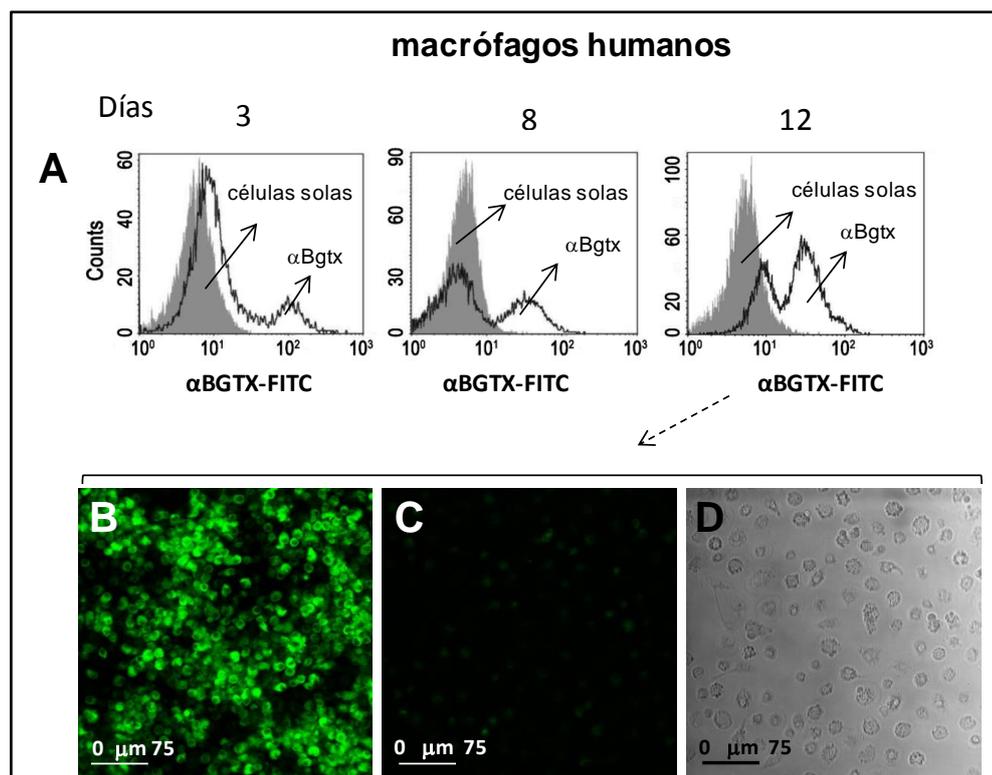


Figura 37.- Expresión del α_7 nAChR en monocitos humanos diferenciados a macrófagos (MØ) durante diferentes periodos de tiempo. La expresión del receptor fue analizada por FACS (A) o por microscopía confocal (B-D). En ambos casos se utilizó la toxina selectiva para α_7 conjugada a un fluoróforo verde (α Bgtx-FITC; 3 μ g.ml⁻¹). En la parte superior se muestran los perfiles de expresión de los sitios de unión de α Bgtx en células CD14⁺ (histogramas de línea negra) y en células controles del mismo día de cultivo no incubadas con anti-CD14 o α Bgtx-FITC (histograma sombreado gris, células solo). Los resultados fueron reproducidos en 4 cultivos independientes. La parte inferior de la figura muestra tres imágenes confocales típicas (reproducidas en 5 cultivos diferentes) de MØ diferenciados durante 12 días y marcados con α Bgtx-FITC en ausencia (B) o tras una preincubación previa con una concentración alta de 500 μ M de nicotina (C). Una imagen de luz transmitida de las células del campo C es mostrada a la derecha (D).

Una vez establecido el periodo óptimo de diferenciación en el que se alcanza el pico de expresión del α_7 nAChR en MØ humanos, se procedió a estudiar si este subtipo de receptor está o no implicado en el incremento de expresión de IRAK-M inducido por nicotina. Con éste propósito, se evaluó si α Bgtx y PNU120596 modificaban el efecto de nicotina, teniendo en cuenta que el primero es un bloqueante potente y específico del α_7 nAChR mientras el segundo es un modulador alostérico positivo de este subtipo de receptor. En estos experimentos, las células fueron preincubadas con α Bgtx (30 min) o con PNU120596 (10 min) antes y durante el periodo de incubación con nicotina (24 h). La α Bgtx bloqueó completamente el efecto de nicotina sobre IRAK-M (Fig. 38A) sin afectar al incremento de expresión de la proteína inducido por LPS (no mostrado). De forma opuesta, PNU120596 produjo una potenciación, concentración-dependiente, del efecto de nicotina sobre IRAK-M, aunque el modulador alostérico no tenía efecto “per se”, aún a la más alta concentración (30 μ M) de PNU120596 ensayada (Fig.38B). Merece la pena resaltar que la concentración de nicotina utilizada en los experimentos de PNU120596 era inferior (100 nM) que la utilizada en experimentos previos; ello se debía a que una concentración baja de nicotina permite apreciar más nítidamente el efecto potenciador del modulador alostérico positivo sobre la señal mediada por el α_7 nAChR.

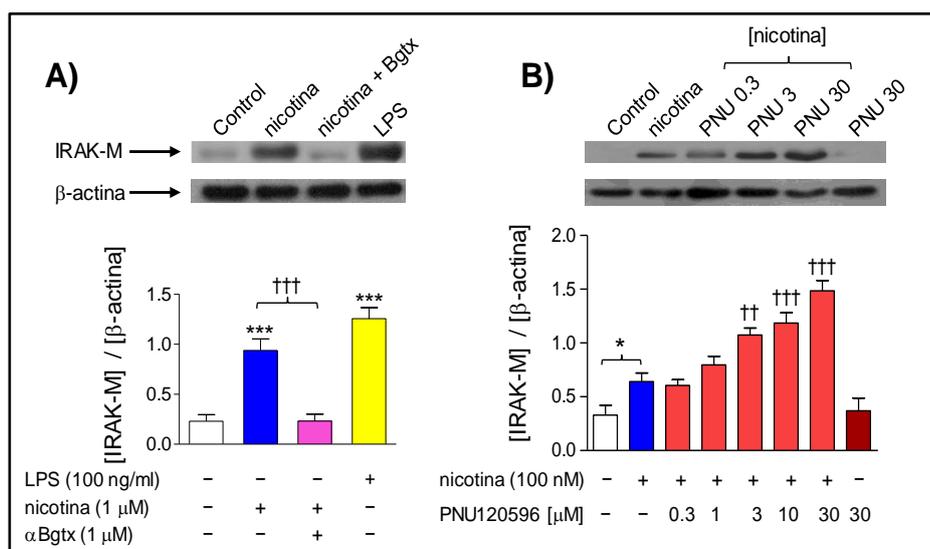


Figura 38.-La sobreexpresión de IRAK-M inducida por nicotina en MØ humanos es bloqueada por α Bgtx (A) y potenciada por PNU120596 (B). Los paneles superiores muestran dos inmunoblots típicos de los efectos de ambos agentes sobre la expresión de IRAK-M inducida por nicotina. En la parte inferior se muestran los valores medios \pm E.E.M. de los datos obtenidos en 5-7 cultivos diferentes ensayados para cada condición experimental. * $p \leq 0,05$ y *** $p \leq 0,001$ después de comparar células estimuladas con nicotina con células no estimuladas del mismo cultivo. †† $p \leq 0,01$ y ††† $p \leq 0,001$ después de comparar células estimuladas con nicotina en ausencia o presencia de α Bgtx o PNU120596.

12 VÍA DE SEÑALIZACIÓN QUE CONECTA EL RECEPTOR α_7 CON IRAK-M.

Con el fin de identificar la vía de señalización implicada en la sobreexpresión de IRAK-M inducida por nicotina a través del α_7 nAChR en MØ humanos, se exploró el efecto sobre dicha sobreexpresión de diversos inhibidores selectivos de diferentes quinasas (MEK, ERK 1/2, p38^{MAPK}, JAK2, PI3K) y factores de transcripción (AP1 y STAT3), a las concentraciones indicadas (Fig. 39). Todos los inhibidores fueron preincubados 30 min antes y durante el estímulo con nicotina (1 μ M, 24 h). Ni PD98059 (inhibidor de MEK1), ni U0126 (inhibidor de ERK 1/2), ni tanshinona II-A (inhibidor de AP-1), ejercieron efecto alguno sobre la sobreexpresión de IRAK-M inducida por nicotina, ni siquiera a la más alta concentración de inhibidor empleada (Fig. 39A). Por el contrario, la inhibición de JAK2 (AG-490), STAT3 (STA-21) o PI3K (LY 294002) redujo un 80% el efecto de nicotina sobre IRAK-M, incluso a la más baja concentración de inhibidor empleada (Fig. 39B). Es interesante resaltar que la inhibición de p38^{MAPK} con SB203580 produjo una reducción parcial, aunque significativa, del efecto de nicotina sobre IRAK-M (Fig. 39A). MØ del mismo cultivo no estimulados con nicotina o incubados con LPS (100 ng.ml⁻¹, 24 h) fueron usados respectivamente como controles negativos y positivos de la expresión de IRAK-M.

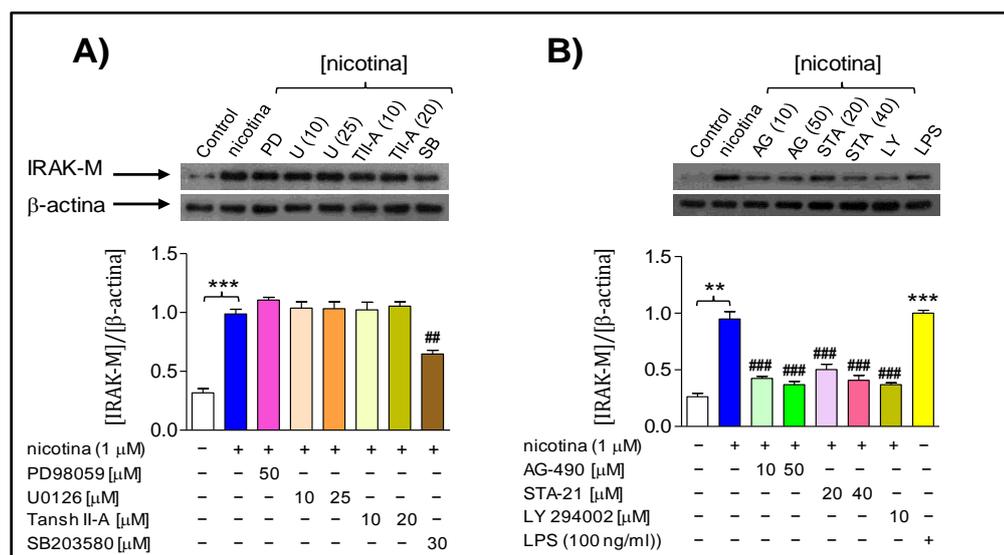


Figura 39.- Interferencia farmacológica de posibles vías de señalización que podrían conectar α_7 nAChRs con IRAK-M en MØ humanos. Efecto de inhibidores selectivos de diferentes quinasas (MEK, ERK1/2, p38^{MAPK}, JAK2, PI3K) y factores de transcripción (AP1, STAT3) sobre la sobreexpresión de IRAK-M inducida por nicotina (24 h). La parte superior de la figura muestra dos inmunoblots típicos con todos los inhibidores ensayados y sus respectivas concentraciones. En la parte inferior se representan los valores medios \pm E.E.M. de los datos obtenidos en 6-8 cultivos diferentes ensayados para cada condición experimental. ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$ después de comparar células del mismo cultivo estimuladas o no-estimuladas con nicotina. ## $p \leq 0,01$ y ### $p \leq 0,001$ después de comparar el efecto del correspondiente inhibidor sobre la sobreexpresión de IRAK-M inducida por nicotina.

13 EL SILENCIAMIENTO DEL GEN DE IRAK-M REVIERTE PARCIALMENTE EL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE NICOTINA SOBRE TNF- α .

Una vez demostrado que nicotina induce la sobreexpresión de IRAK-M a través del α_7 nAChR (presentes experimentos) y que la activación de dicho receptor es responsable del efecto antiinflamatorio de nicotina en macrófagos humanos (Wang y col., 2003), se pasó a analizar si la interferencia de dicha sobreexpresión afectaba al efecto antiinflamatorio de nicotina. Para realizar estos experimentos se utilizaron dos parejas de ARN de interferencia de pequeño tamaño (siRNA) específicos para silenciar la expresión génica del IRAK-M en MØ humanos (parejas 1 y 2; Tabla 11), los cuales fueron transfectados siguiendo el protocolo descrito en la sección de “Materiales y Métodos”. Como control negativo de silenciamiento del gen de IRAK-M se utilizó un siRNA control que no afectaba la expresión de dicho gen (pareja 3; Tabla 11). La eficacia del silenciamiento fue constatada a través del inmunoblot en donde se analizó la expresión de IRAK-M inducida por LPS (100 ng.ml⁻¹; 18 h), en células no transfectadas o en aquellas otras transfectadas con cada una de las tres parejas de siRNA (Fig. 40A). Se observa que solo los siRNA específicos (siRNA-1 y siRNA-2) bloquean la expresión de IRAK-M inducida por LPS, mientras que dicha expresión no se ve afectada por el siRNA control.

El silenciamiento de la expresión génica del IRAK-M en MØ humanos que se acaba de describir tiene la correspondiente traducción funcional, tal como se deduce de los resultados de producción de TNF- α obtenidos en paralelo en las mismas células transfectadas con las 3 parejas de siRNAs y estimuladas con LPS (Fig. 40B). En estos experimentos se realizó, adicionalmente, una preincubación con nicotina en algunos casos. Se observa como la liberación de TNF- α inducida por LPS es bloqueada \approx 50% por nicotina, y como el silenciamiento de IRAK-M con siRNA-1 y siRNA-2 revierte significativamente dicho bloqueo, algo que no se observa con el control siRNA. Que el efecto de nicotina sobre la liberación de TNF- α inducida por LPS se produce a través del α_7 nAChR se corrobora por la desaparición de dicho efecto cuando α Bgtx es preincubada 45 min antes y durante el pretratamiento con nicotina, así como durante todo el periodo de estimulación con LPS.

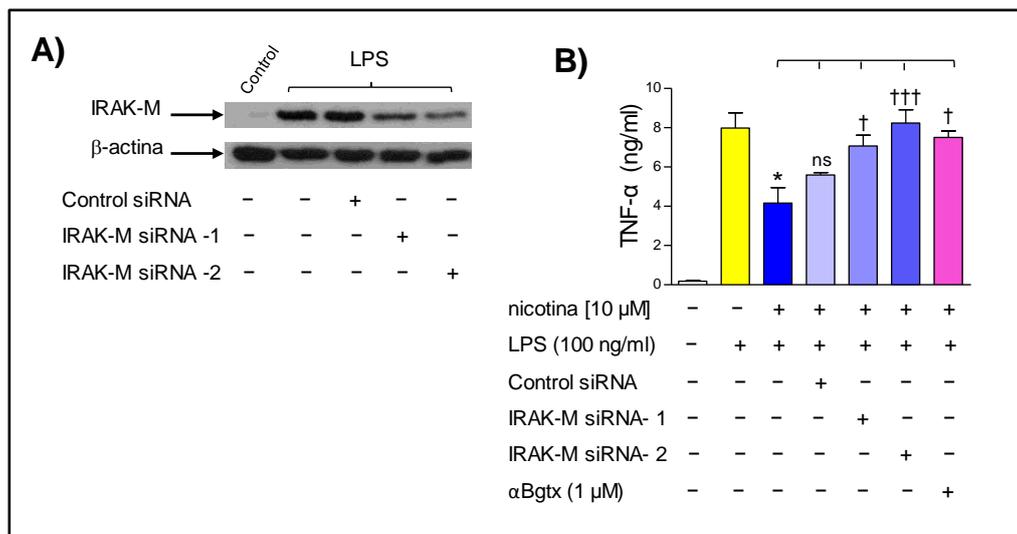


Figura 40.- El silenciamiento del gen de IRAK-M revierte el efecto anti-inflamatorio de nicotina en MØ humanos. Se utilizaron células del mismo cultivo no transfectadas o transfectadas con los siRNAs específicos (siRNA-1 y siRNA-2) para silenciar la expresión del IRAK-M; como silenciador negativo del gen se utilizó el control siRNA. A) Inmunoblot representativo del silenciamiento de IRAK-M en MØ estimulados con LPS. B) Efecto inhibitorio de nicotina sobre la producción de TNF- α inducida por LPS, y reversión de dicho efecto tras el silenciamiento específico de IRAK-M con siRNA-1 y siRNA-2. Nicotina fue preincubada 3 h antes y durante el periodo de estimulación con LPS. Los histogramas muestran los valores medios \pm E.E.M. de 4 cultivos independientes; * $p \leq 0,05$ tras comparar la producción de TNF- α inducida por LPS en ausencia o presencia de nicotina. $^{\dagger}p \leq 0,05$ y $^{\dagger\dagger\dagger}p \leq 0,001$ tras comparar la reversión del efecto de nicotina por los siRNA específicos para IRAK-M de macrófagos humanos.

14 EL PRETRATAMIENTO DE MØ HUMANOS CON NICOTINA INDUCE TOLERANCIA CELULAR ANTE UNA ESTIMULACIÓN CON LPS.

Ya que el pretratamiento de MØ humanos con LPS induce tolerancia celular frente a una segunda exposición a LPS a través de un proceso que implica la sobreexpresión de IRAK-M (del Fresno y col., 2009), procedimos a analizar si nicotina era también capaz de producir un fenómeno similar dado que también induce la expresión de esta pseudoquinasa, tal como se ha demostrado a lo largo de este estudio. Para explorar esta posibilidad utilizamos el modelo de tolerancia esquematizado en la Figura 41A. Brevemente, los MØ humanos fueron sometidos a tres tipos de pretratamiento durante 8 h (medio cultivo, 10 ng.ml⁻¹ de LPS, o 10 μ M de nicotina). Transcurrido este periodo, las células fueron lavadas con medio de cultivo fresco y dejadas en reposo durante 16 h adicionales. Finalmente, las células fueron sometidas a una segunda incubación con LPS (100 ng/ml) por un tiempo adicional de 24 horas antes de analizar la expresión de la proteína IRAK-M o la producción de TNF- α en respuesta a la segunda incubación con LPS. Los resultados de expresión de IRAK-M en respuesta al segundo estímulo con

LPS muestran que el pretratamiento con LPS o nicotina incrementa significativamente dicha expresión respecto a células solo preincubadas con medio de cultivo fresco (Fig. 41B). Estos resultados tienen la correspondiente traducción funcional ya que se observa una disminución significativa de los niveles de TNF- α inducidos por la segunda exposición a LPS en el caso de las células preincubadas con LPS o nicotina frente a las preincubadas con medio de cultivo fresco (Fig. 41C).

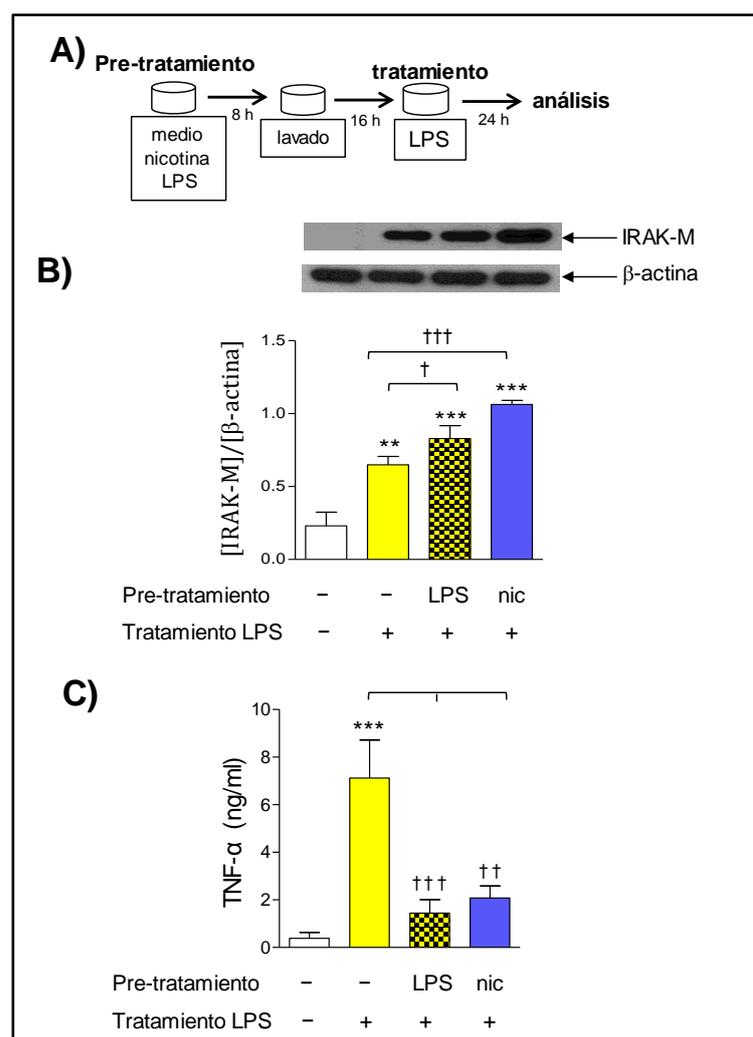


Figura 41.- El pretratamiento con nicotina, al igual que LPS, induce tolerancia a LPS en M ϕ humanos. A) Representación esquemática del protocolo experimental utilizado. B) Análisis por inmunoblot de los niveles de IRAK.M. El panel superior muestra un inmunoblot típico, en la parte inferior se representan los valores medios \pm E.E.M obtenidos en cada condición experimental en 5-7 cultivos diferentes. ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$ después de comparar células sometidas a una segunda estimulación con LPS respecto a células no estimuladas; $^{\dagger}p \leq 0,05$ y $^{\dagger\dagger\dagger}p \leq 0,001$ después de comparar las barras indicadas. C) Concentración de TNF- α determinada por ELISA en los sobrenadantes de células sometidas a los tratamientos indicados. *** $p \leq 0,001$ tras comparar células sometidas a una segunda estimulación con LPS frente a células no estimuladas; $^{\dagger\dagger}p \leq 0,01$ y $^{\dagger\dagger\dagger}p \leq 0,001$ después de comparar las barras indicadas.

15 LA TOLERANCIA INDUCIDA POR NICOTINA AUMENTA LA ACTIVIDAD FAGOCÍTICA DE LOS MØ HUMANOS A TRAVÉS DEL α_7 nAChR.

La tolerancia producida por LPS no solo afecta a la producción de citoquinas sino también a la actividad fagocítica de las células inmunes. Para evaluar si nicotina reproducía dicho efecto, se preincubaron los MØ humanos con 10 μ M de nicotina, 12 h o 30 min, con objeto de inducir tolerancia en el primer caso pero no en el segundo (Fig. 42). Los MØ preincubados con LPS (100 ng.ml⁻¹; 12 h) fueron utilizados como referencia de células tolerantes. Los resultados muestran que aunque un estímulo de 30 min de nicotina es capaz de incrementar significativamente la fagocitosis, dicho incremento es significativamente menor que el observado en MØ tolerantes, independientemente que la tolerancia haya sido producida por LPS o por nicotina (12 h). Más aún, el tratamiento de las células con α Bgtx, 30 min antes y durante el estímulo nicotínico, abolió por completo el efecto de nicotina sobre la actividad fagocítica.

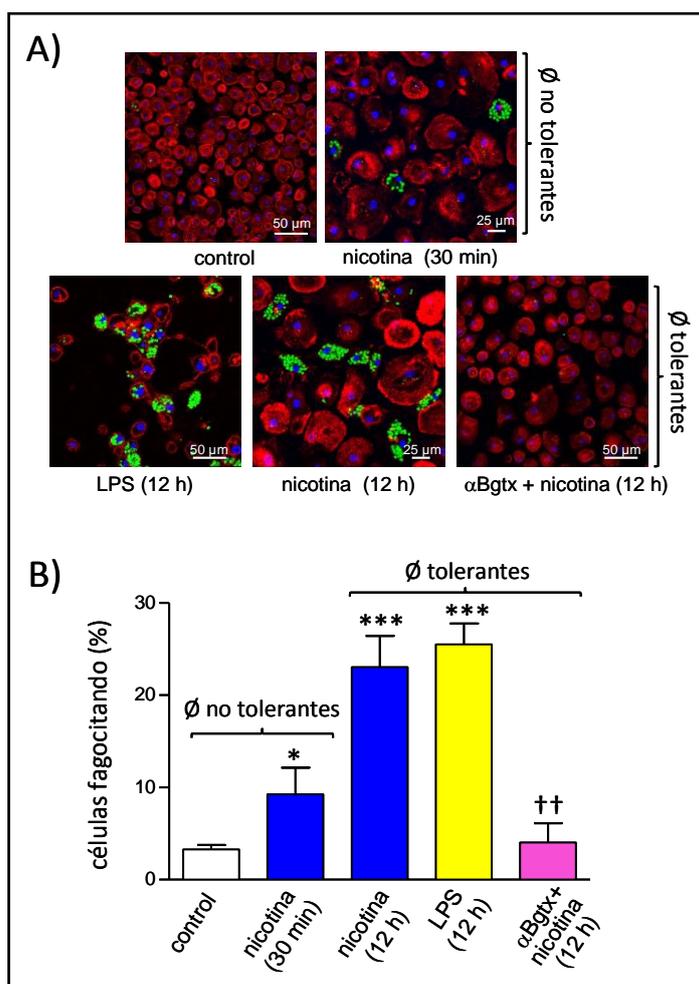


Figura 42.- La inducción de tolerancia por nicotina activa la fagocitosis en MØ humanos a través del α_7 nAChR. Las células fueron cultivadas en cubreobjetos y estimuladas con nicotina o LPS durante el periodo indicado. Posteriormente, las células fueron incubadas con partículas de zimosan-FITC para evaluar su capacidad fagocítica en respuesta a los distintos tratamientos. A) Imágenes confocales de MØ del mismo cultivo bajo las condiciones experimentales que se indican; las células fueron inmuno marcadas para F-actina (rojo) y núcleo (azul), mientras que aquellas que se encontraban fagocitando fueron identificadas por las partículas verdes de zimosan acumuladas en su interior. Células no estimuladas del mismo cultivo fueron utilizadas como control. B) Análisis del número de células fagocitando, expresado como porcentaje del total de células en el campo, en condiciones control o tras el tratamiento indicado. Los histogramas muestran los valores medios \pm E.E.M. de 5 cultivos independientes; * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$ tras comparar células estimuladas con nicotina o LPS con células del mismo cultivo no estimuladas. †† $p \leq 0,01$ tras comparar el efecto de nicotina en presencia o ausencia de α Bgtx.

Discusión

El trabajo de investigación desarrollado en esta Tesis se ha centrado en el estudio del α_7 nAChR, analizando el mecanismo por el que las subunidades α_7 que constituyen este subtipo de receptor interaccionan con la subunidad $\text{dup}\alpha_7$ en células de mamífero, así como las posibles consecuencias funcionales de dicha interacción, especialmente a nivel de la inflamación. Por otra parte, se ha explorado la posibilidad de que IRAK-M, un regulador negativo de la inflamación mediada por TLR, también esté implicado en el efecto antiinflamatorio producido por la activación del α_7 nAChR.

Nuestros resultados muestran que las dos subunidades nicotínicas interaccionan físicamente entre sí constituyendo receptores mixtos $\alpha_7/\text{dup}\alpha_7$ en el RE, algunos de los cuales son capaces de migrar a la membrana celular. Cuanto mayor es la expresión de la subunidad $\text{dup}\alpha_7$ en relación a α_7 , mayor es el número de receptores mixtos $\alpha_7/\text{dup}\alpha_7$ no funcionales y menor el número de α_7 nAChRs homoméricos funcionales que acceden a la membrana celular. En el caso particular de los macrófagos, este tipo de interacción entre las dos subunidades nicotínicas tiene una clara repercusión funcional; así, la expresión de $\text{dup}\alpha_7$ amortigua el efecto antiinflamatorio mediado por la activación del α_7 nAChR.

El presente trabajo también aporta las primeras evidencias experimentales demostrando que nicotina induce la sobreexpresión de IRAK-M en macrófagos humanos y de ratón. En el caso particular de los macrófagos humanos, nuestros datos revelan que el efecto de nicotina es ejercido a través del α_7 nAChR y la consiguiente activación de la vía de señalización JAK2/STAT3/PI3K. Más aún, el incremento de expresión de esta pseudoquinasa contribuye al efecto antiinflamatorio mediado por el α_7 nAChR, así como a la generación de un estado de “tolerancia” en este tipo celular. A continuación se discuten los principales resultados del presente trabajo.

1 LAS SUBUNIDADES α_7 Y $\text{dup}\alpha_7$ INTERACCIONAN FÍSICAMENTE ENTRE SI EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS.

En este trabajo de investigación se recurrió a las técnicas de ADN recombinante para preparar una serie de construcciones conteniendo los ADNc de α_7 y $\text{dup}\alpha_7$ insertados en diferentes vectores de expresión. Para ello se procedió a “etiquetar” α_7 y $\text{dup}\alpha_7$ con los epítomos –HA– y –myc-His–, respectivamente; en otros casos, las subunidades α_7 y $\text{dup}\alpha_7$ fueron marcadas con las proteínas de fusión GFP o Cherry, respectivamente. Con este abordaje experimental se consiguió sortear el problema que suponía la falta de disponibilidad de anticuerpos selectivos frente a $\text{dup}\alpha_7$ o α_7 , dada la homología existente entre sus secuencias peptídicas. De esta manera, la transfección de las anteriores construcciones en líneas celulares de mamífero permitió distinguir fácilmente una subunidad nicotínica de la otra.

La técnica del “etiquetado” de proteínas muy diferentes con una secuencia peptídica corta (epítopo) posibilita el reconocimiento de dichas proteínas mediante la utilización de un anticuerpo específico frente a dicho epítopo. La incorporación del epítopo a una proteína de interés permite revelar muchos aspectos de ésta, dependiendo de la técnica empleada. Así, por ejemplo, se puede conocer su distribución subcelular (por inmunofluorescencia y microscopía confocal, análisis ultraestructural o western blot en fracciones subcelulares), con qué otras proteínas interacciona (por inmunofluorescencia y microscopía confocal, inmunoprecipitación o inmovilización sobre proteína-A-sefarosa), cuál es su función (por inmunoprecipitación y ensayos de actividad del precipitado), o cómo responde ante un determinado estímulo (inmunofluorescencia y microscopía confocal, microscopía electrónica, inmunoprecipitación).

Por su parte, la utilización de proteínas de fusión para marcar una determinada proteína de interés es también una técnica muy empleada en Biología Celular. Este tipo de marcaje permite evaluar la producción de proteínas *in vivo* en numerosos tipos celulares (bacterias, levaduras, células de mamíferos, células de insectos, etc.). La técnica consiste en el clonaje de la secuencia codificante de la proteína “marcadora” al extremo 3' (C-terminal) de la proteína de interés cuya expresión se va a evaluar. La

inclusión de la secuencia de la proteína marcadora debe hacerse en fase, respetando la pauta de lectura. Así se consigue una proteína quimérica formada por la fusión de la proteína de interés-proteína marcadora. Las proteínas de fusión tienen la ventaja adicional de que contienen en su estructura un elemento emisor de luz o cromóforo, lo cual permite una visualización fácil de la proteína de interés sin que la célula transfectada sufra demasiada manipulación.

Tras optimizar el proceso de transfección de todas las construcciones anteriores, se pasó a seleccionar la línea celular de mamífero más idónea para cada diseño experimental, según fuese el objetivo que se fuera a abordar. Así, para analizar la expresión $\text{dup}\alpha_7$ y α_7 y su distribución subcelular, se seleccionaron las células GH4C1 en base a su bien probada eficacia a la hora de expresar heterológicamente α_7 nAChR funcionales (Sweileh y col., 2000; Mexal y col., 2007; Lee y col., 2009), así como al hecho de carecer de receptores nicotínicos nativos que pudieran interferir con los receptores foráneos. Los primeros resultados de microscopía confocal de nuestro estudio, una vez transfectadas por separado las células con la construcción α_7 -HA o $\text{dup}\alpha_7$ -myc, indican que la eficiencia de expresión de la subunidad $\text{dup}\alpha_7$ es similar a la de α_7 , en torno al 12-17% (Fig. 26A); este valor es coincidente con el encontrado previamente para α_7 , y determinado por citometría de flujo, en células GH4C1 transfectadas con la construcción α_7 -GFP (Lee y col., 2009). Otro hallazgo interesante del presente estudio fue la diferente distribución subcelular de ambas subunidades nicotínicas; la subunidad α_7 tiene una expresión elevada en membrana mientras que $\text{dup}\alpha_7$ se localiza fundamentalmente en un área citosólica-submembranal que, probablemente, coincide con el RE (Fig. 26B). Estos resultados parecen indicar que una gran parte del $\text{dup}\alpha_7$ sintetizado quedaría retenido en el RE, lo cual estaría de acuerdo con la previsión realizada por Gault y colaboradores (1998) los cuales, en base a la estructura deducida de esta proteína desprovista de la región N-terminal conteniendo el “péptido señal”, ya propugnaban que $\text{dup}\alpha_7$ debería tener una localización submembranal. Que la subunidad α_7 tiene un alto grado de expresión en la membrana celular, a diferencia de $\text{dup}\alpha_7$, es corroborado tras el análisis utilizando la función de colocalización de Leica, donde se observa claramente un gran número de sitios de colocalización (puntos blancos) entre α_7 -HA y membrana celular pero no entre $\text{dup}\alpha_7$ -

myc y membrana (Fig. 26C). Esta diferencia de acceso a membrana entre las dos subunidades nicotínicas en el caso de células de mamífero, como son las GH4C1, está de acuerdo con lo encontrado previamente por nuestro grupo en células de anfibio (de Lucas-Cerrillo y col., 2011). Asimismo, es importante resaltar que no todas las subunidades α_7 expresadas acceden a la membrana celular, lo cual es lógico teniendo en cuenta que, en células musculares de ratón, se ha descrito que solo un 30% de las subunidades nicotínicas sintetizadas son capaces de alcanzar la membrana celular, permaneciendo el resto intracelularmente (Eimer y col., 2007).

Diversos autores han encontrado que la subunidad $\text{dup}\alpha_7$ se expresa nativamente en cerebro humano (Araud y col., 2011), leucocitos humanos (Villiger y col., 2002), líneas celulares monocíticas humanas (THP-1, U937, Mono-Mac-6) y en monocitos/macrófagos humanos (Benfante y col., 2010). También ha sido descrita la expresión heteróloga de $\text{dup}\alpha_7$ en oocitos de *Xenopus* (de Lucas-Cerrillo y col., 2011; Araud y col., 2011) y en líneas celulares tales como GH4C1 (de Lucas-Cerrillo y col., 2011) y SHEP (Araud y col., 2011). Adicionalmente, nuestro grupo también ha demostrado, a través de experimentos electrofisiológicos, de fijación de radioligandos y de inmunomarcaje y microscopía confocal realizados en oocitos, que $\text{dup}\alpha_7$ se comporta como modulador endógeno de la actividad de α_7 (de Lucas-Cerrillo y col., 2011; Araud y col., 2011). Sin embargo, si dicha interacción se produce también en líneas celulares de mamíferos no ha podido ser evaluado hasta ahora.

El presente estudio intenta resolver la anterior cuestión en células GH4C1 cotransfectadas con la pareja de construcciones α_7 -HA y $\text{dup}\alpha_7$ -myc, o con la pareja α_7 -GFP y $\text{dup}\alpha_7$ -Cherry. Para ello se ha recurrido a una serie de técnicas complementarias que incluyen experimentos de inmunocitoquímica, microscopía confocal, e inmunoprecipitación (coexpresión de α_7 -HA y $\text{dup}\alpha_7$ -myc) o experimentos de FRET (coexpresión de α_7 -GFP y $\text{dup}\alpha_7$ -Cherry). Los resultados del inmunomarcaje y visualización, por microscopía confocal, de las dos subunidades nicotínicas expresadas muestran una colocalización de ambas en todas las células en las que se produce la coexpresión (Fig. 27A). Más aún, los experimentos de coinmunoprecipitación ratifican el resultado anterior y prueban la existencia de una

interacción física entre α_7 y $\text{dup}\alpha_7$ en células GH4C1 doblemente transfectadas (Fig. 27B). Por último, los resultados de FRET, utilizando dos proporciones distintas de ambas construcciones en la transfección, revelan la existencia de una interacción física entre las dos subunidades nicotínicas a nivel de la membrana celular, lo cual parece sugerir la probable existencia de algunos receptores mixtos $\alpha_7/\text{dup}\alpha_7$ en el caso de las células doblemente transfectadas (Fig. 28). Más aun, los datos de eficiencia de FRET indican que el número de estos receptores mixtos aumenta conforme se incrementa la proporción de $\text{dup}\alpha_7$ en la mezcla $\alpha_7\text{-HA}/\text{dup}\alpha_7\text{-myc}$ transfectada. Estos últimos resultados no solo avalan la interacción física entre ambas subunidades nicotínicas tras su coexpresión en células de mamíferos, sino que también parecen indicar que la subunidad α_7 , al ensamblarse con subunidades $\text{dup}\alpha_7$ en RE formando receptores heteroméricos, consigue arrastrar a esta última subunidad en su migración a membrana, algo que difícilmente puede hacer la subunidad $\text{dup}\alpha_7$ por si sola. Algunos de los resultados de citometría de flujo que se comentaran a continuación refrendan esta última posibilidad.

De hecho, nuestros resultados de citometría de flujo obtenidos en células GH4C1 cotransfectadas con la combinación $\alpha_7\text{-HA}/\text{dup}\alpha_7\text{-myc}$, en distinta proporción, revelan que la interacción entre α_7 y $\text{dup}\alpha_7$ modifica, en sentido opuesto, la incorporación a membrana de una u otra subunidad nicotínica (Fig. 29A). Así, la expresión de $\text{dup}\alpha_7$ en la membrana de las células cotransfectadas con $\alpha_7\text{-HA}/\text{dup}\alpha_7\text{-myc}$ se incrementó en paralelo a la proporción de $\text{dup}\alpha_7$ en la mezcla $\alpha_7\text{-HA}/\text{dup}\alpha_7\text{-myc}$ transfectada, mientras que es prácticamente indetectable en células sin transfectar con α_7 . Por tanto, estos datos de citometría de flujo llegan a la misma conclusión alcanzada por los resultados de FRET; esto es, $\text{dup}\alpha_7$ solo es capaz migrar a la membrana de las células GH4C1 en presencia de la subunidad α_7 , probablemente formando parte de un receptor mixto $\alpha_7/\text{dup}\alpha_7$. Por el contrario, cuando se analiza es la expresión de α_7 en la membrana celular, se observa que ésta es máxima en células no cotransfectadas con $\text{dup}\alpha_7$, reduciéndose significativamente en células cotransfectadas con $\text{dup}\alpha_7$. De hecho, dicha reducción fue tanto mayor cuanto más alta era la proporción de $\text{dup}\alpha_7$ en la combinación $\alpha_7\text{-HA}/\text{dup}\alpha_7\text{-myc}$ transfectada. Resultados previos de nuestro grupo y de otros grupos obtenidos en ovocitos inyectados con los ARNms de ambas subunidades

nicotínicas llegan a algunas conclusiones coincidentes con las obtenidas en el presente estudio, aunque más preliminares (de Lucas-Cerrillo y col., 2011; Araud y col., 2011). Así, estos trabajos previos también encuentran que la expresión de $\text{dup}\alpha_7$ en la membrana del ovocito es prácticamente inexistente y que la coinyección del ARNm de $\text{dup}\alpha_7$ junto al de α_7 reduce la expresión de esta última subunidad nicotínica en la membrana.

La existencia de receptores mixtos $\alpha_7/\text{dup}\alpha_7$ expresados nativamente en distintos tipos celulares, incluyendo los leucocitos y los macrófagos humanos, ha sido propuesta por diversos autores aunque sin una evidencia experimental directa (Villiger y col., 2002; Benfante y col., 2011). Estos receptores mixtos podrían tener diferente localización subcelular. Algunos autores proponen que la coexpresión de $\text{dup}\alpha_7$ junto a α_7 conduciría al secuestro de esta última subunidad nicotínica en el RE, imposibilitando así el acceso a membrana del α_7 nAChR funcional (Araud y col., 2011). Otra segunda posibilidad, compatible con la anterior, sería la de que un receptor heteromérico $\alpha_7/\text{dup}\alpha_7$, con menor o nula actividad funcional, accediera a membrana (de Lucas-Cerrillo y col., 2011; Benfante y col., 2011). Ambas hipótesis servirían para explicar el efecto dominante negativo de $\text{dup}\alpha_7$ sobre la actividad del α_7 nAChR encontrada en ovocitos (de Lucas-Cerrillo y col., 2011; Araud y col., 2011). Nuestros resultados de FRET, citometría de flujo e inmunocitoquímica (Figs. 28 y 29) obtenidos en células GH4C1 avalan la segunda hipótesis en relación con la expresión en la membrana celular de un receptor mixto $\alpha_7/\text{dup}\alpha_7$. Sin embargo este hallazgo sería compatible con el secuestro de subunidades α_7 en el RE por parte de subunidades $\text{dup}\alpha_7$, tal como se deduce de los datos obtenidos en el presente estudio en células HEK293 transfectadas con ambas subunidades nicotínicas junto con la chaperona RIC-3, en donde se aprecia la retención casi total de subunidades α_7 y $\text{dup}\alpha_7$ en esta estructura celular marcada con calnexina, a pesar de que se ha demostrado que la coexpresión de la chaperona en esta línea celular permite la migración a membrana de una pequeña proporción de α_7 nAChR funcionales en células transfectadas con la construcción α_7 -GFP (Alexander y col., 2010).

2 LA INTERACCIÓN ENTRE LAS SUBUNIDADES α_7 Y $\text{dup}\alpha_7$ EN MACRÓFAGOS TIENE CONSECUENCIAS FUNCIONALES A NIVEL DE LA INFLAMACIÓN.

Para que la interacción entre α_7 y $\text{dup}\alpha_7$ tenga relevancia fisiopatológica es preciso que dicha interacción tenga consecuencias funcionales. Por ello se analizó la repercusión funcional de dicha interacción en células RAW264.7, una línea celular de macrófagos de ratón que expresa endógenamente α_7 nAChRs funcionales (Li y col., 2009) con un papel bien definido. De hecho, la activación de este subtipo de receptor por agonistas nicotínicos produce un claro efecto antiinflamatorio en diversos tipos de macrófagos al prevenir la activación de NF- κ B así como la producción de citoquinas proinflamatorias inducida por LPS (Wang y col., 2004; Yoshikawa y col., 2006; de Jonge y Ulloa, 2007; The y col., 2007). Nuestros resultados de microscopía confocal corroboran la expresión endógena de α_7 nAChRs en células RAW264.7, así como su capacidad de expresar eficientemente la subunidad $\text{dup}\alpha_7$ foránea tras la nucleofección celular con la construcción $\text{dup}\alpha_7\text{-myc}$ (Fig. 31). Más aún, los resultados de microscopía confocal (Fig. 32), combinados con los datos de bioluminiscencia en células transfectadas con el plásmido pNF- κ B-luciferasa (Fig. 33A), así como los datos de ELISA (Fig. 33B) obtenidos en este mismo tipo celular indican que la coexpresión de $\text{dup}\alpha_7$ previene parcialmente el efecto antiinflamatorio de nicotina, tanto a nivel de la activación de NF- κ B como de la producción de TNF- α inducida por LPS.

Diversos mecanismos han sido propuestos para explicar cómo nicotina, a través del α_7 nAChR, interfiere con la activación de NF- κ B. Entre estos mecanismos se incluyen la inhibición de la fosforilación de I κ B α (Li y col., 2011; Yoshikawa y col., 2006) o la disminución de la translocación de NF- κ B-p65 al núcleo (Li y col., 2011). En base a los hallazgos previos del presente estudio en relación al tipo de interferencia ejercida por $\text{dup}\alpha_7$ sobre el α_7 nAChR en células GH4C1, se puede deducir que $\text{dup}\alpha_7$ debe estar revirtiendo el efecto de nicotina sobre NF- κ B en los macrófagos a nivel del primer paso de la cascada de señalización, esto es interfiriendo con la formación del número de α_7 nAChR funcionales.

Ha sido demostrado previamente que los niveles de expresión del ARNm de $\text{dup}\alpha_7$ son modulados negativamente por distintos estímulos, como LPS, nicotina o IL-1 β (de Lucas-Cerrillo y col., 2011, Benfante y col., 2011). También ha sido descrito que nicotina y LPS incrementan el ARNm de α_7 (van der Zanden y col., 2012; Benfante y col., 2011). Esta modulación antagónica conduciría a una alteración de la relación $\alpha_7/\text{dup}\alpha_7$ existente en un determinado tipo celular. Dado que la subunidad $\text{dup}\alpha_7$ es expresada endógenamente en macrófagos y neuronas humanas, junto a la subunidad α_7 , existe la posibilidad de que esta nueva subunidad nicotínica juegue un papel determinante como factor regulador de la actividad del α_7 nAChR en estos dos tipos celulares, tanto en el control de la inflamación como en el control de la liberación de neurotransmisores, respectivamente. En conjunto nuestros resultados no solo apoyan que dicha posibilidad parece ser real en macrófagos, sino que también arrojan luz sobre el mecanismo por el que ambas subunidades nicotínicas interaccionan entre sí en células de mamíferos

3 EL REGULADOR NEGATIVO DE LA INFLAMACIÓN MEDIADA POR TLR (IRAK-M) ESTÁ TAMBIÉN IMPLICADO EN EL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE NICOTINA A TRAVÉS DEL α_7 nAChR.

Los resultados del presente estudio muestran que nicotina induce, a nivel transcripcional, la sobreexpresión de IRAK-M en macrófagos humanos en un grado similar a como lo hace LPS, un estímulo utilizado como referente para la inducción de esta pseudoquinasa (Fig. 34). Más aún, la cinética de expresión del ARNm de IRAK-M inducida por el agonista colinérgico reproduce la descrita previamente para LPS en monocitos humanos, leucocitos sanguíneos y macrófagos de ratón, donde la máxima expresión es alcanzada 3-6 horas tras la estimulación (Kobayashi y col., 2002; Escoll y col., 2003; del Fresno y col., 2005).

Es importante resaltar que la sobreexpresión de IRAK-M inducida por nicotina en macrófagos humanos también se observa en macrófagos de una especie diferente, como son las células RAW264.7 de ratón. Así, la concentración umbral de nicotina o el curso temporal de exposición a este estímulo producen un patrón de expresión de

IRAK-M similar en ambos tipos de macrófagos (Figs. 35 y 36). Más aún, los resultados relativos el curso temporal de nicotina en los dos tipos de macrófagos son muy similares a los descritos previamente en macrófagos murinos incubados con otros estimulantes de esta pseudoquinasa, como adiponectina o LPS (Zacharioudaki y col., 2009). En conjunto, todos estos datos indican que la sobreexpresión de IRAK-M inducida por nicotina es un fenómeno reproducible en macrófagos, independientemente de la especie analizada.

Es bien conocido que la estimulación del nervio vago en el animal intacto (roedores), así como la exposición a ACh o nicotina de macrófagos humanos o de ratón en cultivo, inhibe la producción de TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, HMGB1, PGE₂ y MIP-1 α inducida por LPS (Borovikova y col., 2000; Wang y col., 2003; Wang y col., 2004). Los anteriores estudios también demuestran que el efecto antiinflamatorio producido por la estimulación vagal o por los agonistas colinérgicos se ejerce a través del α_7 nAChR. No obstante, se ha descrito otro subtipo de nAChR, el $\alpha_4\beta_2$, identificado en macrófagos alveolares de ratón, como responsable del efecto antiinflamatorio de nicotina en respuesta a *Legionella pneumophila*, un patógeno causante de neumonía (Matsunaga y col., 2001). Así, la preincubación de estos macrófagos con nicotina reduce significativamente la producción de TNF- α , IL-6 y IL-12 inducida por el patógeno; el efecto de nicotina es completamente bloqueado por el antagonista no selectivo de los nAChRs, *d*-tubocurarina, pero no por α Bgtx.

Aunque los estudios que se acaban de mencionar sugieren que, al menos, dos subtipos de nAChRs podrían estar implicados en el efecto de nicotina sobre IRAK-M en macrófagos, nuestros resultados en macrófagos humanos demuestran que solo el α_7 nAChR parece estar implicado en el anterior efecto (Fig. 38). Así, el antagonista específico de este subtipo de receptor, la α Bgtx, produce un bloqueo completo del efecto nicotina sobre IRAK-M, mientras que el modulador alostérico positivo del α_7 nAChR (Gronlien y col., 2007), el PNU120596 potencia significativamente, de forma concentración-dependiente, dicho efecto. Cabe señalar que los macrófagos humanos utilizados en nuestros experimentos presentan una abundante expresión endógena de α_7 nAChRs, como se puede constatar por las imágenes de microscopía confocal y los

resultados de citometría de flujo utilizando α -Bgtx-FITC como marcador de este subtipo de receptor (Fig. 37).

Ha sido descrito que el α_7 nAChR es capaz de interactuar con más de 50 proteínas diferentes lo cual conduce a la activación de múltiples vías de señalización (de Jonge y col., 2005; Blanchet y col., 2006; Wang y col., 2003; Shaw y col., 2002; El Kouhen y col., 2009; Young y col., 2009; Buckingham y col., 2009). Sin embargo, los resultados del presente trabajo en macrófagos humanos acotan el número de posibles vías de comunicación capaces de conectar α_7 nAChR con el IRAK-M. Así, solo dos quinasas (JAK2 y PI3K) y un factor de transcripción (STAT3) parecen ser necesarios para que nicotina produzca su efecto, tal como se deduce del hecho que solo los inhibidores selectivos respectivos de estos tres componentes de vías de señalización, AG-490, LY-294002 y STA-21, bloquean completamente la sobreexpresión de IRAK-M en respuesta a nicotina (Fig. 39B). Este hallazgo en relación con el α_7 nAChR y el IRAK-M, es una nueva demostración del papel clave atribuido a JAK2, PI3K y STAT3 en muchas otras respuestas fisiopatológicas mediadas por el α_7 nAChR (Shaw y col., 2002; de Jonge y col., 2005; Blanchet y col., 2006). Nuestros datos también permiten excluir a la vía MAPK, a diferentes niveles, en el efecto de nicotina sobre IRAK-M (Fig. 39A). Una excepción a esta última afirmación es el hallazgo del bloqueo parcial de la sobreexpresión de IRAK-M inducida por nicotina tras la inhibición de $p38^{\text{MAPK}}$ (con SB203580). La contribución de $p38^{\text{MAPK}}$ al efecto de nicotina podría ser explicada por la habilidad de este miembro de la familia MAPK de actuar a nivel post-transcripcional mediante la regulación de la estabilidad del ARNm de IRAK-M y la traducción a la correspondiente proteína, como ha sido previamente descrito en el caso de algunas citoquinas, factores de transcripción o receptores de membrana (Clark y col., 2003; Karin y col., 2006). Alternativamente, nuestros resultados también podrían explicarse por la existencia de un bucle autocrino/paracrino entre $p38^{\text{MAPK}}$ y STAT3 (Bode y col., 2012), el cual también podría contribuir a la sobreexpresión de IRAK-M inducida por nicotina.

Existen dos posibles mecanismos que podrían explicar nuestros resultados a la hora de establecer la conexión entre el α_7 nAChR y el IRAK-M. El primer mecanismo

apuntaría a que la estimulación del receptor produciría la activación directa de JAK2, la cual podría fosforilar tanto a STAT3 como a PI3K (Fukao y col., 2003; Zacharioudaki y col., 2009; Deng y col., 2013; Yang y col., 2011); ambas moléculas señalizadoras activadas podrían, eventualmente y de manera independiente, conducir a un aumento de expresión de IRAK-M. El segundo mecanismo consistiría en una única cascada de señalización con un papel preponderante para PI3K, cuya capacidad para fosforilar a STAT3 a través de un receptor no tirosina quinasa, como BMX, ha sido recientemente revelada en neuronas de ganglios nodosos (Heldsinger y col., 2011), y en algunas líneas de cáncer humanas (Vogt y col., 2011).

En relación con el primer mecanismo esbozado más arriba, no existe aún ninguna evidencia experimental demostrando la activación transcripcional del gen de IRAK-M en respuesta a la activación de STAT3. Sin embargo, es interesante mencionar que cuando se realizó el análisis ChIP en la línea linfoblástica GM12878, utilizando la base de datos del proyecto ENCODE (ENCODE PROJECT, 2011), identificamos zonas hipersensibles a ADNasa I y a marcas de la histona H3K27 dentro del primer intrón del gen de IRAK-M. Las zonas de ADN con esas características corresponden a regiones con mayor disponibilidad para la unión de elementos regulatorios activos, incluyendo el factor de transcripción STAT3. De hecho, ha sido demostrado que la fosforilación de STAT3 mediada por el α_7 nAChR de macrófagos peritoneales de ratón es capaz de activar la transcripción de otros reguladores negativos de la inflamación, tales como SOCS-3 (de Jonge y col., 2005). Por otra parte, también ha sido demostrado que la activación de PI3K por estímulos diferentes a nicotina, tales como adiponectina o LPS, produce una sobreexpresión de IRAK-M en macrófagos (Fukao y col., 2003; Zacharioudaki y col., 2009; Yang y col., 2011; Deng y col., 2013).

Una vez demostrado que nicotina incrementa la expresión de IRAK-M a través del α_7 nAChR en distintas especies de macrófagos, incluyendo los humanos, así como la posible vía de señalización que comunica el receptor y la pseudoquinasa, nos planteamos la hipótesis de que la sobreexpresión de IRAK-M contribuyese también al bien constatado efecto antiinflamatorio de nicotina. Los resultados del presente estudio comparando el efecto antiinflamatorio de nicotina, a través de la liberación de TNF- α

inducida por LPS, en macrófagos humanos no manipulados frente a aquellos otros con el gen de IRAK-M silenciado avalan la anterior hipótesis (Fig. 40B). Así, el silenciamiento del gen con las dos parejas de siRNA, constatado mediante inmunoblot (Fig. 40A), revierte parcialmente el efecto antiinflamatorio de nicotina. Estos resultados de nicotina amplían el número de estímulos capaces de regular negativamente la inflamación inducida LPS a través de la sobreexpresión de IRAK-M; entre estos estímulos se incluyen la adiponectina, algunos polifenoles, gangliósidos (Shen y col., 2008; Zacharioudaki y col., 2009; Nak-Yun y col., 2013).

Puesto que la sobreexpresión de IRAK-M inducida por LPS es un elemento determinante en el fenómeno de TE (Escoll y col., 2003; López-Collazo y col., 2006; van Veer y col., 2007), nos propusimos evaluar si el incremento de IRAK-M inducido por nicotina en macrófagos humanos era capaz de generar un estado transitorio similar al producido por LPS mediante el cual las células se hacen refractarias a posteriores estimulaciones con LPS. Para ello se recurrió a cuantificar la producción celular de TNF- α en respuesta a LPS, ya que se ha demostrado que esta citoquina proinflamatoria es un excelente marcador de los monocitos tolerantes (Flohe y col., 1999; Escoll y col., 2003). Nuestros resultados indican que la preincubación con nicotina, al igual que ocurre con la preexposición a LPS, anula casi completamente la capacidad celular para producir TNF- α en respuesta a una segunda exposición a LPS (Fig. 41C). Adicionalmente, también se observa que la sobreexpresión de IRAK-M inducida por el segundo estímulo de LPS es significativamente mayor en macrófagos tolerantes (preexpuestos a LPS o nicotina) que en aquellos no sometidos a ningún tipo de pretratamiento (Fig. 41B).

Los macrófagos llevan a cabo un paso crítico en el proceso de resolución de la inflamación, como es el incremento de su actividad fagocítica en respuesta a diferentes estímulos. Se ha descrito previamente que los macrófagos tolerantes en respuesta a una preexposición prolongada a LPS muestran una actividad fagocítica aumentada (del Fresno y col., 2009). Por ello, se procedió a evaluar si la preexposición prolongada de estas células a nicotina que, como se acaba de demostrar, genera en ellas un estado de tolerancia, reproduce el efecto de LPS sobre la fagocitosis. Nuestros resultados en

macrófagos humanos revelan que este es el caso (Fig. 42); la actividad fagocítica de estas células es significativamente mayor en aquellas tolerantes (preexpuestas a nicotina o LPS durante 12 h) respecto a las no tolerantes (controles o expuestas a nicotina por un periodo insuficiente para inducir la expresión de IRAK-M y generar tolerancia). El efecto de nicotina sobre la fagocitosis es dependiente de la activación del α_7 nAChR, como lo demuestra el hecho de que α Bgtx prevenga completamente dicho efecto.

En conjunto, los resultados del presente estudio revelan un nuevo mecanismo, como es la sobreexpresión de IRAK-M, implicado en el efecto antiinflamatorio de nicotina a través del α_7 nAChR. Adicionalmente, nuestros datos también indican que, además del anterior efecto antiinflamatorio, la exposición prolongada a nicotina genera un estado refractario o de deficitaria respuesta inmune ante un proceso infeccioso o ante un proceso inflamatorio. Todos estos efectos de nicotina podrían tener importantes consecuencias en procesos patológicos en los que la sobreexpresión de IRAK-M pudiera ser determinante (Hubbard y Moore, 2010). Así, el efecto de nicotina sobre IRAK-M ayudaría a explicar la conocida asociación entre el tabaquismo activo y el bajo riesgo y la mejor evolución clínica de la colitis ulcerosa en los individuos fumadores (Mahid y col., 2006). Frente a esto, existen otras situaciones clínicas en los que el incremento de la expresión de IRAK-M podría debilitar una defensa inmune eficaz; esto podría explicar parcialmente que el riesgo de sufrir una neumonía adquirida en la comunidad o una infección del tejido periodontal sea varias veces superior en los sujetos fumadores que en los no fumadores (Arcavi y Benowitz, 2004; Johnson y Hill, 2004).

Conclusiones

Las principales conclusiones de este trabajo se resumen en los siguientes puntos:

1. La distribución celular de las subunidades α_7 -HA y $\text{dup}\alpha_7$ -myc expresadas separadamente en células GH4C1 transfectadas con las correspondientes construcciones difiere sustancialmente; mientras que la primera subunidad se incorpora a la membrana celular, la segunda muestra una localización submembranal.
2. Las subunidades α_7 -HA y $\text{dup}\alpha_7$ -myc se asocian físicamente tras su coexpresión en células GH4C1, probablemente formando receptores híbridos α_7 -HA/ $\text{dup}\alpha_7$ -myc capaces de migrar a la membrana celular. No obstante, la mayor proporción de subunidades α_7 -HA y $\text{dup}\alpha_7$ -myc parecen quedar retenidas en RE, como se observa en células HEK293.
3. Dependiendo de cual sea la relación α_7 -HA: $\text{dup}\alpha_7$ -myc expresada en células GH4C1, así será la incorporación a membrana de una u otra subunidad nicotínica. Mientras que la expresión de α_7 -HA en membrana es tanto menor conforme la proporción de $\text{dup}\alpha_7$ -myc se incrementa, la expresión de $\text{dup}\alpha_7$ -myc en esta estructura celular solo es detectable cuando se coexpresa con α_7 -HA.
4. La interacción física entre las dos subunidades nicotínicas tiene consecuencias funcionales, como se deduce del hecho de que $\text{dup}\alpha_7$ revierta parcialmente la acción antiinflamatoria de nicotina a través del α_7 nAChR en la línea de macrófagos de ratón RAW264.7.
5. Los anteriores resultados sugieren que $\text{dup}\alpha_7$ posee un efecto dominante negativo sobre la actividad del α_7 nAChR en células de mamífero, tanto de naturaleza neuroendocrina como inmune. Dicho efecto se produce, posiblemente, por la conformación de un receptor heteromérico $\alpha_7/\text{dup}\alpha_7$ expresado en membrana. Al carecer de sitios de unión para la ACh, $\text{dup}\alpha_7$ estaría mermando la capacidad funcional de dicho receptor.

6. Nicotina incrementa, a nivel transcripcional, la expresión de IRAK-M en todos los tipos de macrófagos ensayados.
7. El efecto de nicotina sobre IRAK-M en MØ humanos se inicia con la activación del α_7 nAChR y el consiguiente disparo de la vía de señalización JAK2/STAT3/PI3K.
8. El incremento de expresión de IRAK-M inducido por nicotina en MØ humanos contribuye al efecto antiinflamatorio mediado por el α_7 nAChR así como a la generación de un estado de “tolerancia” en este tipo celular.
9. Los resultados recogidos en las conclusiones 6-8 pueden explicar la asociación encontrada entre el tabaquismo activo y el riesgo y la evolución clínica de determinados procesos patológicos en los que una sobreexpresión de IRAK-M puede ser determinante. Este es el caso de la colitis ulcerosa, la neumonía adquirida en la comunidad, o la infección del tejido periodontal, entre otras patologías.

Bibliografía

- ADLER, L.E., OLINCY, A., WALDO, M., HARRIS, J.G., GRIFFITH, J., STEVENS, K., FLACH, K., NAGAMOTO, H., BICKFORD, P., LEONARD, S. and FREEDMAN, R., 1998. Schizophrenia, sensory gating, and nicotinic receptors. *Schizophr Bull* **24**: 189-202.
- AKIRA, S. and TAKEDA, K., 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**: 499-511.
- ALBUQUERQUE, E.X., PEREIRA, E.F., ALKONDON, M. and ROGERS, S.W., 2009. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* **89**: 73-120.
- ALEXANDER, J.K., SAGHER, D., KRIVOSHEIN, A.V., CRIADO, M., JEFFORD, G. and GREEN, W.N., 2010. Ric-3 promotes $\alpha 7$ nicotinic receptor assembly and trafficking through the ER subcompartment of dendrites. *J Neurosci* **30**: 10112-10126.
- ANDERSON, D.J. and BLOBEL, G., 1981. In vitro synthesis, glycosylation, and membrane insertion of the four subunits of Torpedo acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 5598-5602.
- ARAUD, T., GRAW, S., BERGER, R., LEE, M., NEVEU, E., BERTRAND, D., and LEONARD, S., 2011. The chimeric gene *CHRFAM7A*, a partial duplication of the *CHRNA7* gene, is a dominant negative regulator of $\alpha 7$ nAChR function. *Biochem Pharmacol* **82**: 904-914.
- ARCAVI, L., AND BENOWITZ, N.L., 2004. Cigarette smoking and infection. *Arch Int Med* **164**: 2206-2216.
- ARIAS, H.R., RICHARDS, V.E., NG, D., GHAFoori, M.E., LE, V. and MOUSA, S.A., 2009. Role of non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors in angiogenesis. *Int J Biochem Cell* **41**: 1441-1451.
- ARREDONDO, J., CHERNYAVSKY, A.I., JOLKOVSKY, D.L., PINKERTON, K.E. and GRANDO, S.A., 2006. Receptor-mediated tobacco toxicity: cooperation of the Ras/Raf-1/MEK1/ERK and JAK-2/STAT-3 pathways downstream of $\alpha 7$ nicotinic receptor in oral keratinocytes. *FASEB J* **20**: 2093-2101.
- AZAM, L., WINZER-SERHAN, U. and LESLIE, F.M., 2003. Co-expression of $\alpha 7$ and $\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs within rat brain cholinergic neurons. *Neurosci* **119**: 965-977.
- BEESON, B.P., 1946. Development of tolerance to typhoid bacterial pyrogen and its abolition by reticulo-endothelial blockade. *Proc Soc Exp Biol Med* **61**: 248-250.
- BENFANTE, R., ANTONINI, R.A., DE PIZZOL, M., GOTTI, C., CLEMENTI, F., LOCATI, M., and FORNASARI, D., 2011. Expression of the $\alpha 7$ nAChR subunit duplicate form (*CHRFAM7A*) is down-regulated in the monocytic cell line THP-1 on treatment with LPS. *J Neuroimmunol* **230**: 74-84.
- BISWAS, S.K. and LOPEZ-COLLAZO, E., 2009. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunology* **30**: 475-487.
- BLANCHET, M.R., ISRAEL-ASSAYAG, E., DALEAU, P., BEAULIEU, M.J. and CORMIER, Y., 2006. Dimethylphenylpiperazinium, a nicotinic receptor agonist, downregulates inflammation in monocytes/macrophages through PI3K and PLC chronic activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **291**: 577-63.
- BLOUNT, P. and MERLIE, J.P., 1989. Molecular basis of the two nonequivalent ligand binding sites of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* **3**: 349-357.

- BLOUNT, P., SMITH, M.M. and MERLIE, J.P., 1990. Assembly intermediates of the mouse muscle nicotinic acetylcholine receptor in stably transfected fibroblasts. *J Cell Biol* **111**: 2601-2611.
- BOER, H., HOLLAND, A., WHITTINGTON, J., BUTLER, J., WEBB, T. and CLARKE, D., 2002. Psychotic illness in people with Prader Willi syndrome due to chromosome 15 maternal uniparental disomy. *Lancet* **359**: 135-136.
- BOND, C.E., ZIMMERMANN, M. and GREENFIELD, S.A., 2009. Upregulation of alpha7 Nicotinic Receptors by Acetylcholinesterase C-Terminal Peptides. *PLoS One* **4**: 4846-4860.
- BOROVIKOVA, L.V., IVANOVA, S., ZHANG, M., YANG, H., BOTCHKINA, G.I., WATKINS, L.R., WANG, H., ABUMRAD, N., EATON, J.W. and TRACEY, K.J., 2000. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* **405**: 458-462.
- BOULTER, J., EVANS, K., GOLDMAN, D., MARTIN, G., TRECO, D., HEINEMANN, S. and PATRICK, J., 1986. Isolation of a cDNA clone coding for a possible neural nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunit. *Nature* **319**: 368-374.
- BRILEY, M.S. and CHANGEUX, J.P., 1977. Isolation and purification of the nicotinic acetylcholine receptor and its functional reconstitution into a membrane environment. *Int Rev Neurobiol* **20**: 31-63.
- BRISSON, A. and UNWIN, P.N., 1984. Tubular crystals of acetylcholine receptor. *J Cell Biol* **99**: 1202-1211.
- BROAD, A., JONES, D.E., and KIRBY, J.A., 2006. Toll-like receptor (TLR) response tolerance: a key physiological damage limitation effect and an important potential opportunity for therapy. *Curr Med Chem* **13**: 2487-2502.
- BROADBENT, S., GROOT-KORMELINK, P.J., KRASHIA, P.A., HARKNESS, P.C., MILLAR, N.S., BEATO, M. and SIVILOTTI, L.G., 2006. Incorporation of the beta3 subunit has a dominant-negative effect on the function of recombinant central-type neuronal nicotinic receptors. *Mol Pharmacol* **70**: 1350-1357.
- BROWN, J., WANG, H., SUTTLES, J., GRAVES, D.T. and MARTIN, M., 2011. Mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) negatively regulates Toll-like receptor 4-mediated inflammatory response via FoxO1. *J Biol Chem* **286**:44295-44305.
- BUCKINGHAM, S.D., JONES, A.K., BROWN, L.A. and SATTELLE, D.B., 2009. Nicotinic acetylcholine receptor signalling: roles in Alzheimer's disease and amyloid neuroprotection. *Pharmacol Rev* **61**: 39-61.
- BUISSON, B. and BERTRAND, D., 2001. Chronic exposure to nicotine upregulates the human (alpha)4((beta)2) nicotinic acetylcholine receptor function. *J Neurosci* **21**:1819-1829.
- BURNS, K., JANSSENS, S., BRISSONI, B., OLIVOS, N., BEYAERT, R. and TSCHOPP, J., 2003. Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J Exp Med* **197**: 263-268.
- CAMMAROTA, M., BEVILAQUA, L.R., VIOLA, H., KERR, D.S., REICHMANN, B., TEIXEIRA, V., BULLA, M., IZQUIERDO, I. and MEDINA, J.H., 2002. Participation of CaMKII in neuronal plasticity and memory formation. *Cell Mol Neurobiol* **22**: 259-267.
- CARLIN, B.E., LAWRENCE, J.C., Jr, LINDSTROM, J.M. and MERLIE, J.P., 1986. An acetylcholine receptor precursor alpha subunit that binds alpha-bungarotoxin but not d-tubocurarine. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 498-502.

- CASaubon, L.K., MELANSON, M., LOPES-CENDES, I., MARINEAU, C., ANDERMANN, E., ANDERMANN, F., WEISSENBACH, J., PREVOST, C., BOUCHARD, J.P., MATHIEU, J. and ROULEAU, G.A., 1996. The gene responsible for a severe form of peripheral neuropathy and agenesis of the corpus callosum maps to chromosome 15q. *Am J Hum Genet* **58**:28-34.
- CASTILLO, M., MULET, J., ALDEA, M., GERBER, S., SALA, S., SALA, F. and CRIADO, M., 2009. Role of the N-terminal alpha-helix in biogenesis of alpha7 nicotinic receptors. *J Neurochem* **108**: 1399-1409.
- CASTILLO, M., MULET, J., GUTIERREZ, L.M., ORTIZ, J.A., CASTELAN, F., GERBER, S., SALA, S., SALA, F. and CRIADO, M., 2005. Dual role of the RIC-3 protein in trafficking of serotonin and nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* **280**: 27062-27068.
- CAVAILLON, J., and ADIB-CONQUY, M., 2006. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care* **10**:55-65.
- CELIE, P.H., KLAASSEN, R.V., VAN ROSSUM-FIKKERT, S.E., VAN ELK, R., VAN NIEROP, P., SMIT, A.B. and SIXMA, T.K., 2005. Crystal structure of acetylcholine-binding protein from *Bulinus truncatus* reveals the conserved structural scaffold and sites of variation in nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* **280**: 26457-26466.
- CHANGEUX, J.P. and EDELSTEIN, S.J., 1998. Allosteric receptors after 30 years. *Neuron* **21**: 959-980.
- CHEN, D., DANG, H. and PATRICK, J.W., 1998. Contributions of N-linked glycosylation to the expression of a functional alpha7-nicotinic receptor in *Xenopus* oocytes. *J Neurochem* **70**: 349-357.
- CHEN, D. and PATRICK, J.W., 1997. The alpha-bungarotoxin-binding nicotinic acetylcholine receptor from rat brain contains only the alpha7 subunit. *J Biol Chem* **272**: 24024-24029.
- CHRISTIAN, S.L., FANTES, J.A., MEWBORN, S.K., HUANG, B. and LEDBETTER, D.H., 1999. Large genomic duplicons map to sites of instability in the Prader-Willi/Angelman syndrome chromosome region (15q11-q13). *Hum Mol Genet* **8**: 1025-1037.
- CHRISTIANSON, J.C. and GREEN, W.N., 2004. Regulation of nicotinic receptor expression by the ubiquitin-proteasome system. *EMBO J* **23**: 4156-4165.
- COLOMBO, S.F., MAZZO, F., PISTILLO, F. and GOTTI, C., 2013. Biogenesis, trafficking and up-regulation of nicotinic ACh receptors. *Biochem Pharmacol* **86**: 1063-1073.
- CONRAD, B. and ANTONARAKIS, S.E., 2007. Gene duplication: a drive for phenotypic diversity and cause of human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **8**: 17-35.
- CORRINGER, P.J., SALLETTE, J. and CHANGEUX, J.P., 2006. Nicotine enhances intracellular nicotinic receptor maturation: a novel mechanism of neural plasticity? *J Physiol Paris* **99**: 162-171.
- COURT, J., SPURDEN, D., LLOYD, S., MCKEITH, I., BALLARD, C., CAIRNS, N., KERWIN, R., PERRY, R. and PERRY, E., 1999. Neuronal nicotinic receptors in dementia with Lewy bodies and schizophrenia: alpha-bungarotoxin and nicotine binding in the thalamus. *J Neurochem* **73**: 1590-1597.

- CRIADO, M., MULET, J., CASTILLO, M., GERBER, S., SALA, S. and SALA, F., 2010. The loop between beta-strands beta 2 and beta 3 and its interaction with the N-terminal alpha-helix is essential for biogenesis of alpha 7 nicotinic receptors. *J Neurochem* **112**: 103-111.
- COURT, J.A., MARTIN-RUIZ, C., GRAHAM, A. and PERRY, E., 2000. Nicotinic receptors in human brain: topography and pathology. *J Chem Neuroanat* **20**: 281-298.
- CUEVAS, J. and BERG, D.K., 1998. Mammalian nicotinic receptors with alpha7 subunits that slowly desensitize and rapidly recover from alpha-bungarotoxin blockade. *J Neurosci* **18**: 10335-10344.
- CUEVAS, J., ROTH, A.L. and BERG, D.K., 2000. Two distinct classes of functional 7-containing nicotinic receptor on rat superior cervical ganglion neurons. *J Physiol* **525**: 735-746.
- DAJAS-BAILADOR, F. and WONNACOTT, S., 2004. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci* **25**: 317-324.
- DAJAS-BAILADOR, F.A., LIMA, P.A. and WONNACOTT, S., 2000. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subtype mediates nicotine protection against NMDA excitotoxicity in primary hippocampal cultures through a Ca(2+) dependent mechanism. *Neuropharmacology* **39**: 2799-2807.
- DAJAS-BAILADOR, F.A., SOLIAKOV, L. and WONNACOTT, S., 2002. Nicotine activates the extracellular signal-regulated kinase 1/2 via the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor and protein kinase A, in SH-SY5Y cells and hippocampal neurones. *J Neurochem* **80**: 520-530.
- DANI, J.A. and BERTRAND, D., 2007. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**: 699-729.
- DE JONGE, W.J., THE, F.O., VAN DER ZANDEN, E.P., VAN DEN WIJNGAARD, R.M. and BOECKXSTAENS, G.E., 2005. Inflammation and gut motility; neural control of intestinal immune cell activation. *J Pediatr Gastroenterol Nutri* **41**:S10-1.
- DE JONGE, W.J. and ULLOA, L., 2007. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. *Br J Pharmacol* **151**: 915-929.
- DE LUCA, V., LIKHODI, O., VAN TOL, H.H., KENNEDY, J.L. and WONG, A.H., 2006. Regulation of alpha7-nicotinic receptor subunit and alpha7-like gene expression in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand* **114**: 211-215.
- DE LUCAS-CERRILLO, A.M., MALDIFASSI, M.C., ARNALICH, F., RENART, J., ATIENZA, G., SERANTES, R., CRUCES, J., SANCHEZ-PACHECO, A., ANDRES-MATEOS, E. and MONTIEL, C., 2011. Function of partially duplicated human alpha77 nicotinic receptor subunit CHRFAM7A gene: potential implications for the cholinergic anti-inflammatory response. *J Biol Chem*, **286**: 594-606.
- DEL FRESNO, C., GARCIA-RIO, F., GOMEZ-PINA, V., SOARES-SCHANOSKI, A., FERNANDEZ-RUIZ, I., JURADO, T., KAJIJI, T., SHU, C., MARIN, E., GUTIERREZ DEL ARROYO, A., PRADOS, C., ARNALICH, F., FUENTES-PRIOR, P., BISWAS, S.K. and LOPEZ-COLLAZO, E., 2009. Potent phagocytic activity with impaired antigen presentation identifying lipopolysaccharide-tolerant human monocytes: demonstration in isolated monocytes from cystic fibrosis patients. *J Immunol* **182**: 6494-6507.

- DEMPSTER, E.L., TOULOPOULOU, T., MCDONALD, C., BRAMON, E., WALSH, M., WICKHAM, H., SHAM, P.C., MURRAY, R.M. and COLLIER, D.A., 2006. Episodic memory performance predicted by the 2bp deletion in exon 6 of the "alpha 7-like" nicotinic receptor subunit gene. *Am J Psychiatry* **163**: 1832-1834.
- DENG, H., MAITRA, U., MORRIS, M. and LI, L., 2013. Molecular mechanism responsible for the priming of macrophage activation. *J Biol Chem* **288**: 3897-3906.
- DEVILLERS-THIERY, A., GIRAUDAT, J., BENTABOULET, M. and CHANGEUX, J.P., 1983. Complete mRNA coding sequence of the acetylcholine binding alpha-subunit of *Torpedo marmorata* acetylcholine receptor: a model for the transmembrane organization of the polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 2067-2071.
- DICKINSON, J.A., KEW, J.N. and WONNACOTT, S., 2008. Presynaptic alpha 7- and beta 2-containing nicotinic acetylcholine receptors modulate excitatory amino acid release from rat prefrontal cortex nerve terminals via distinct cellular mechanisms. *Mol Pharmacol* **74**: 348-359.
- DRISDEL, R.C. and GREEN, W.N., 2000. Neuronal alpha-bungarotoxin receptors are alpha7 subunit homomers. *J Neurosci* **20**: 133-139.
- EIMER, S., GOTTSCHALK, A., HENGARTNER, M., HORVITZ, H.R., RICHMOND, J., SCHAFER, W.R. and BESSEREAU, J.L., 2007. Regulation of nicotinic receptor trafficking by the transmembrane Golgi protein UNC-50. *EMBO J* **26**: 4313-4323.
- ESCOLL, P., DEL FRESNO, C., GARCIA, L., VALLES, G., LENDINEZ, M.J., ARNALICH, F. and LOPEZ-COLLAZO, E., 2003. Rapid up-regulation of IRAK-M expression following a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients. *Biochem biophys Res Commun* **311**: 465-472.
- FAAS, M.M., MOES, H., FIJEN, J.W., MULLER KOBOLD, A.C., TULLEKEN, J.E., and ZIJLSTRA, J.G., 2002. Monocyte intracellular cytokine production during human endotoxaemia with or without a second in vitro LPS challenge: effect of RWJ-67657, a p38 MAP-kinase inhibitor, on LPS-hyporesponsiveness. *Clin Exp Immunol* **127**: 337-343.
- FABIAN-FINE, R., SKEHEL, P., ERRINGTON, M.L., DAVIES, H.A., SHER, E., STEWART, M.G. and FINE, A., 2001. Ultrastructural distribution of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunit in rat hippocampus. *J Neurosci* **21**: 7993-8003.
- FEHER, A., JUHASZ, A., RIMANOCZY, A., CSIBRI, E., KALMAN, J. and JANKA, Z., 2009. Association between a genetic variant of the alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor subunit and four types of dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* **28**:56-62.
- FENSTER, C.P., WHITWORTH, T.L., SHEFFIELD, E.B., QUICK, M.W. and LESTER, R.A., 1999. Upregulation of surface alpha4beta2 nicotinic receptors is initiated by receptor desensitization after chronic exposure to nicotine. *J Neurosci* **19**: 4804-4814.
- FLOMEN, R.H., COLLIER, D.A., OSBORNE, S., MUNRO, J., BREEN, G., ST CLAIR, D. and MAKOFF, A.J., 2006. Association study of CHRFAM7A copy number and 2 bp deletion polymorphisms with schizophrenia and bipolar affective disorder. *Am J Med Genetics* **141B**: 571-575.
- FREEDMAN, R., HALL, M., ADLER, L.E. and LEONARD, S., 1995. Evidence in postmortem brain tissue for decreased numbers of hippocampal nicotinic receptors in schizophrenia. *Biol Psychiatry* **38**: 22-33.

- FREEDMAN, R., LEONARD, S., GAULT, J.M., HOPKINS, J., CLONINGER, C.R., KAUFMANN, C.A., TSUANG, M.T., FARONE, S.V., MALASPINA, D., SVRAKIC, D.M., SANDERS, A. and GEJMAN, P., 2001. Linkage disequilibrium for schizophrenia at the chromosome 15q13-14 locus of the alpha7-nicotinic acetylcholine receptor subunit gene (CHRNA7). *Am J Med Genet* **105**: 20-22.
- FREUDENBERG, M.A., and GALANOS, C., 1988. Induction of tolerance to lipopolysaccharide (LPS)-D-galactosamine lethality by pretreatment with LPS is mediated by macrophages. *Infect Immun* **56**: 1352-1357.
- GAHRING, L.C., DAYS, E.L., KAASCH, T., GONZALEZ DE MENDOZA, M., OWEN, L., PERSIYANOV, K. and ROGERS, S.W., 2005. Pro-inflammatory cytokines modify neuronal nicotinic acetylcholine receptor assembly. *J Neuroimmunol* **166**: 88-101.
- GAULT, J., HOPKINS, J., BERGER, R., DREBING, C., LOGEL, J., WALTON, C., SHORT, M., VIANZON, R., OLINCY, A., ROSS, R.G., ADLER, L.E., FREEDMAN, R. and LEONARD, S., 2003. Comparison of polymorphisms in the alpha7 nicotinic receptor gene and its partial duplication in schizophrenic and control subjects. *Am J Med Genet* **123B**: 39-49.
- GAULT, J., ROBINSON, M., BERGER, R., DREBING, C., LOGEL, J., HOPKINS, J., MOORE, T., JACOBS, S., MERIWETHER, J., CHOI, M.J., KIM, E.J., WALTON, K., BUITING, K., DAVIS, A., BREESE, C., FREEDMAN, R. and LEONARD, S., 1998. Genomic organization and partial duplication of the human alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene (CHRNA7). *Genomics* **52**: 173-185.
- GHIA, J.E., BLENNERHASSETT, P., KUMAR-ONDIVEERAN, H., VERDU, E.F. and COLLINS, S.M., 2006. The vagus nerve: a tonic inhibitory influence associated with inflammatory bowel disease in a murine model. *Gastroenterology* **131**: 1122-1130.
- GOTTI, C., MORETTI, M., GAIMARRI, A., ZANARDI, A., CLEMENTI, F. and ZOLI, M., 2007. Heterogeneity and complexity of native brain nicotinic receptors. *Biochem Pharmacol* **74**: 1102-1111.
- GRADY, S.R., SALMINEN, O., LAVERTY, D.C., WHITEAKER, P., MCINTOSH, J.M., COLLINS, A.C. and MARKS, M.J., 2007. The subtypes of nicotinic acetylcholine receptors on dopaminergic terminals of mouse striatum. *Biochem Pharmacol* **74**: 1235-1246.
- GRANOWITZ, E.V., PORAT, R., MIER, J.W., ORENCOLE, S.F., KAPLANSKI, G., LYNCH, E.A., YE, K., VANNIER, E., WOLFF, S.M., and DINARELLO, C.A., 1993. Intravenous endotoxin suppresses the cytokine response of peripheral blood mononuclear cells of healthy humans. *The journal of immunology*, **151**(3), pp. 1637-1645.
- GRAY, R., RAJAN, A.S., RADCLIFFE, K.A., YAKEHIRO, M. and DANI, J.A., 1996. Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature* **383**: 713-716.
- GREEN, W.N. and CLAUDIO, T., 1993. Acetylcholine receptor assembly: subunit folding and oligomerization occur sequentially. *Cell* **74**: 57-69.
- GREEN, W.N. and MILLAR, N.S., 1995. Ion-channel assembly. *Trends Neurosci* **18**: 280-287.
- GREEN, W.N. and WANAMAKER, C.P., 1997. The role of the cystine loop in acetylcholine receptor assembly. *J Biol Chem* **272**: 20945-20953.
- GU, Y., CAMACHO, P., GARDNER, P. and HALL, Z.W., 1991. Identification of two amino acid residues in the epsilon subunit that promote mammalian muscle acetylcholine receptor assembly in COS cells. *Neuron* **6**: 879-887.

- GU, Y., RALSTON, E., MURPHY-ERDOSH, C., BLACK, R.A. and HALL, Z.W., 1989. Acetylcholine receptor in a C2 muscle cell variant is retained in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **109**: 729-738.
- GUAN, Z.Z., ZHANG, X., BLENNOW, K. and NORDBERG, A., 1999. Decreased protein level of nicotinic receptor alpha7 subunit in the frontal cortex from schizophrenic brain. *Neuroreport* **10**: 1779-1782.
- GUHA, M. and MACKMAN, N., 2002. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J Biol Chem* **277**: 32124-32132.
- GUO, X. and WECKER, L., 2002. Identification of three cAMP-dependent protein kinase (PKA) phosphorylation sites within the major intracellular domain of neuronal nicotinic receptor alpha4 subunits. *J Neurochem* **82**: 439-447.
- HALEVI, S., MCKAY, J., PALFREYMAN, M., YASSIN, L., ESHEL, M., JORGENSEN, E. and TREININ, M., 2002. The *C. elegans* ric-3 gene is required for maturation of nicotinic acetylcholine receptors. *EMBO J* **21**: 1012-1020.
- HAMANO, R., TAKAHASHI, H.K., IWAGAKI, H., YOSHINO, T., NISHIBORI, M. and TANAKA, N., 2006. Stimulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor inhibits CD14 and the toll-like receptor 4 expression in human monocytes. *Shock* **26**: 358-364.
- HANSEN, S.B., SULZENBACHER, G., HUXFORD, T., MARCHOT, P., TAYLOR, P. and BOURNE, Y., 2005. Structures of Aplysia AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations. *EMBO J* **24**: 3635-3646.
- HELDSINGER, A., GRABAUSKAS, G., SONG, I. and OWYANG, C., 2011. Synergistic interaction between leptin and cholecystokinin in the rat nodose ganglia is mediated by PI3K and STAT3 signaling pathways: implications for leptin as a regulator of short term satiety. *J Biol Chem* **286**: 11707-11715.
- HENDRICKSON, L.M., GUILDFORD, M.J. and TAPPER, A.R., 2013. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: common molecular substrates of nicotine and alcohol dependence. *Front Psychiatry* **4**: 29.
- HOENTJEN, F., SARTOR, R.B., OZAKI, M. and JOBIN, C., 2005. STAT3 regulates NF-kappaB recruitment to the IL-12p40 promoter in dendritic cells. *Blood* **105**: 689-696.
- HONG, C.J., LAI, I.C., LIOU, L.L. and TSAI, S.J., 2004. Association study of the human partially duplicated alpha7 nicotinic acetylcholine receptor genetic variant with bipolar disorder. *Neurosci Lett* **355**: 69-72.
- HUBBARD, L.L. and MOORE, B.B., 2010. IRAK-M regulation and function in host defense and immune homeostasis. *Infectious disease reports* **2**: e9.
- HUSTON, J.M., GALLOWITSCH-PUERTA, M., OCHANI, M., OCHANI, K., YUAN, R., ROSAS-BALLINA, M., ASHOK, M., GOLDSTEIN, R.S., CHAVAN, S., PAVLOV, V.A., METZ, C.N., YANG, H., CZURA, C.J., WANG, H. and TRACEY, K.J., 2007. Transcutaneous vagus nerve stimulation reduces serum high mobility group box 1 levels and improves survival in murine sepsis. *Crit Care Med* **35**: 2762-2768.
- HUSTON, J.M., OCHANI, M., ROSAS-BALLINA, M., LIAO, H., OCHANI, K., PAVLOV, V.A., GALLOWITSCH-PUERTA, M., ASHOK, M., CZURA, C.J., FOXWELL, B., TRACEY, K.J. and ULLOA, L., 2006. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *J Exp Med* **203**: 1623-1628.

- IWATA, Y., NAKAJIMA, M., YAMADA, K., NAKAMURA, K., SEKINE, Y., TSUCHIYA, K.J., SUGIHARA, G., MATSUZAKI, H., SUDA, S., SUZUKI, K., TAKEI, N., MORI, N., IWAYAMA, Y., TAKAO, H., YOSHIKAWA, T., RILEY, B., MAKOFF, A., SHAM, P., CHEN, R. and COLLIER, D., 2007. Linkage disequilibrium analysis of the CHRNA7 gene and its partially duplicated region in schizophrenia. *Neurosci Res* **57**: 194-202.
- JIN, H.J., LI, H.T., SUI, H.X., XUE, M.Q., WANG, Y.N., WANG, J.X. and GAO, F.G., 2012. Nicotine stimulated bone marrow-derived dendritic cells could augment HBV specific CTL priming by activating PI3K-Akt pathway. *Immunol Lett* **146**: 40-49.
- JOHNSON, G.K., and HILL, M., 2004. Cigarette smoking and the periodontal patient. *J Periodontol* **75**: 196-209.
- JONES, A.K. and SATTELLE, D.B., 2010. Diversity of insect nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Adv ExpMed Biol* **683**: 25-43.
- KAR MAHAPATRA, S., BHATTACHARJEE, S., CHAKRABORTY, S.P., MAJUMDAR, S. and ROY, S., 2011. Alteration of immune functions and Th1/Th2 cytokine balance in nicotine-induced murine macrophages: immunomodulatory role of eugenol and N-acetylcysteine. *Int Immunopharmacol* **11**: 485-495.
- KHIROUG, S.S., HARKNESS, P.C., LAMB, P.W., SUDWEEKS, S.N., KHIROUG, L., MILLAR, N.S. and YAKEL, J.L., 2002. Rat nicotinic ACh receptor alpha7 and beta2 subunits co-assemble to form functional heteromeric nicotinic receptor channels. *J Physiol* **540**: 425-434.
- KIHARA, T., SHIMOHAMA, S., SAWADA, H., HONDA, K., NAKAMIZO, T., SHIBASAKI, H., KUME, T. and AKAIKE, A., 2001. alpha 7 nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block A beta-amyloid-induced neurotoxicity. *J Biol Chem* **276**: 13541-13546.
- KOBAYASHI, K., HERNANDEZ, L.D., GALAN, J.E., JANEWAY, C.A., Jr, MEDZHITOV, R. and FLAVELL, R.A., 2002. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* **110**: 191-202.
- KOPELMAN, N.M., LANCET, D. and YANAI, I., 2005. Alternative splicing and gene duplication are inversely correlated evolutionary mechanisms. *Natu Genet* **37**: 588-589.
- KOPERNIAK, T.M., GARG, B.K., BOLTAX, J. and LORING, R.H., 2013. Cell-specific effects on surface alpha7 nicotinic receptor expression revealed by over-expression and knockdown of rat RIC3 protein. *J Neurochem* **124**: 300-309.
- KORNFELD, R. and KORNFELD, S., 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* **54**: 631-664.
- KUBALEK, E., RALSTON, S., LINDSTROM, J. and UNWIN, N., 1987. Location of subunits within the acetylcholine receptor by electron image analysis of tubular crystals from *Torpedo marmorata*. *J Cell Biol* **105**: 9-18.
- LANSDELL, S.J., GEE, V.J., HARKNESS, P.C., DOWARD, A.I., BAKER, E.R., GIBB, A.J. and MILLAR, N.S., 2005. RIC-3 enhances functional expression of multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes in mammalian cells. *Mol Pharmacol* **68**: 1431-1438.
- LE NOVERE, N. and CHANGEUX, J.P., 1995. Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J Mol Evol* **40**: 155-172.

- LEE, H.K., GWALANI, L., MISHRA, V., ANANDJIWALA, P., SALA, F., SALA, S., BALLESTA, J.J., O'MALLEY, D., CRIADO, M. and LORING, R.H., 2009. Investigating the role of protein folding and assembly in cell-type dependent expression of alpha7 nicotinic receptors using a green fluorescent protein chimera. *Brain Res* **1259**: 7-16.
- LEONARD, S. and FREEDMAN, R., 2006. Genetics of chromosome 15q13-q14 in schizophrenia. *Biol Psychiatry* **60**: 115-122.
- LEONARD, S., GAULT, J., ADAMS, C., BREESE, C.R., ROLLINS, Y., ADLER, L.E., OLINCY, A. and FREEDMAN, R., 1998. Nicotinic receptors, smoking and schizophrenia. *Restor Neurol Neurosci* **12**: 195-201.
- LEONARD, S., GAULT, J., HOPKINS, J., LOGEL, J., VIANZON, R., SHORT, M., DREBING, C., BERGER, R., VENN, D., SIROTA, P., ZERBE, G., OLINCY, A., ROSS, R.G., ADLER, L.E. and FREEDMAN, R., 2002. Association of promoter variants in the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunit gene with an inhibitory deficit found in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* **59**: 1085-1096.
- LI, D.J., TANG, Q., SHEN, F.M., SU, D.F., DUAN, J.L. and XI, T., 2009. Overexpressed alpha7 nicotinic acetylcholine receptor inhibited proinflammatory cytokine release in NIH3T3 cells. *J Biosci Bioeng* **108**: 85-91.
- LI, D.P., PAN, Y.Z. and PAN, H.L., 2001. Acetylcholine attenuates synaptic GABA release to supraoptic neurons through presynaptic nicotinic receptors. *Brain Res* **920**: 151-158.
- LI, Q., ZHOU, X.D., KOLOSOV, V.P. and PERELMAN, J.M., 2011. Nicotine reduces TNF-alpha expression through a alpha7 nAChR/MyD88/NF-kB pathway in HBE16 airway epithelial cells. *Cell Physiol Biochem* **27**: 605-612.
- LIU, Q., HUANG, Y., SHEN, J., STEFFENSEN, S. and WU, J., 2012. Functional alpha7beta2 nicotinic acetylcholine receptors expressed in hippocampal interneurons exhibit high sensitivity to pathological level of amyloid beta peptides. *BMC Neurosci* **13**: 155-2202-13-155.
- LOCKE, D.P., ARCHIDIACONO, N., MISCEO, D., CARDONE, M.F., DESCHAMPS, S., ROE, B., ROCCHI, M. and EICHLER, E.E., 2003. Refinement of a chimpanzee pericentric inversion breakpoint to a segmental duplication cluster. *Genome Biol* **4**: R50.
- LOPEZ-COLLAZO, E., FUENTES-PRIOR, P., ARNALICH, F. and DEL FRESNO, C., 2006. Pathophysiology of interleukin-1 receptor-associated kinase-M: implications in refractory state. *Curr Opin Infect Dis* **19**: 237-244.
- MAHID, S.S., MINOR, K.S., SOTO, R.E., HORNUNG, C.A. and GALANDIUK, S., 2006. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc* **81**: 1462-1471.
- MARTINEZ, F.O., 2012. Analysis of gene expression and gene silencing in human macrophages. *Curr Prot Immunol* **14**:1-23.
- MARUTLE, A., ZHANG, X., COURT, J., PIGGOTT, M., JOHNSON, M., PERRY, R., PERRY, E. and NORDBERG, A., 2001. Laminar distribution of nicotinic receptor subtypes in cortical regions in schizophrenia. *J Chem Neuroanat* **22**: 115-126.
- MATSUNAGA, K., KLEIN, T.W., FRIEDMAN, H. and YAMAMOTO, Y., 2001. Involvement of nicotinic acetylcholine receptors in suppression of antimicrobial activity and cytokine responses of alveolar macrophages to Legionella pneumophila infection by nicotine. *J Immunol* **167**: 6518-6524.
- MCGEHEE, D.S. and ROLE, L.W., 1995. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Ann Rev Physiol* **57**:521-546.

- MECHAWAR, N., SAGHATELYAN, A., GRAILHE, R., SCORIELS, L., GHEUSI, G., GABELLEC, M.M., LLEDO, P.M. and CHANGEUX, J.P., 2004. Nicotinic receptors regulate the survival of newborn neurons in the adult olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 9822-9826.
- MERLIE, J.P. and LINDSTROM, J., 1983. Assembly in vivo of mouse muscle acetylcholine receptor: identification of an alpha subunit species that may be an assembly intermediate. *Cell* **34**: 747-757.
- MEXAL, S., BERGER, R., LOGEL, J., ROSS, R.G., FREEDMAN, R. and LEONARD, S., 2010. Differential regulation of alpha7 nicotinic receptor gene (CHRNA7) expression in schizophrenic smokers. *J Mol Neurosci* **40**: 185-195.
- MILLAR, N.S. and GOTTI, C., 2009. Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* **56**: 237-246.
- MILLAR, N.S. and HARKNESS, P.C., 2008. Assembly and trafficking of nicotinic acetylcholine receptors (Review). *Mol Membr Biol* **25**: 279-292.
- MISHINA, M., KUROSAKI, T., TOBIMATSU, T., MORIMOTO, Y., NODA, M., YAMAMOTO, T., TERAO, M., LINDSTROM, J., TAKAHASHI, T. and KUNO, M., 1984. Expression of functional acetylcholine receptor from cloned cDNAs. *Nature* **307**: 604-608.
- MORONI, M., ZWART, R., SHER, E., CASSELS, B.K. and BERMUDEZ, I., 2006. Alpha4beta2 Nicotinic Receptors with High and Low Acetylcholine Sensitivity: Pharmacology, Stoichiometry, and Sensitivity to Long-Term Exposure to Nicotine. *Mol Pharmacol* **70**: 755-768.
- MUKHERJEE, J., KURYATOV, A., MOSS, S.J., LINDSTROM, J.M. and ANAND, R., 2009. Mutations of cytosolic loop residues impair assembly and maturation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurochem* **110**: 1885-1894.
- NAKAGAWA, R., NAKA, T., TSUTSUI, H., FUJIMOTO, M., KIMURA, A., ABE, T., SEKI, E., SATO, S., TAKEUCHI, O., TAKEDA, K., AKIRA, S., YAMANISHI, K., KAWASE, I., NAKANISHI, K. and KISHIMOTO, T., 2002. SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity* **17**: 677-687.
- NAKAYAMA, H., NUMAKAWA, T., IKEUCHI, T. and HATANAKA, H., 2001. Nicotine-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase and CREB in PC12h cells. *J Neurochem* **79**: 489-498.
- NAKAYAMA, K., OKUGAWA, S., YANAGIMOTO, S., KITAZAWA, T., TSUKADA, K., KAWADA, M., KIMURA, S., HIRAI, K., TAKAGAKI, Y. and OTA, Y., 2004. Involvement of IRAK-M in peptidoglycan-induced tolerance in macrophages. *J Biol Chem* **279**: 6629-6634.
- NAK-YUN, S., MI-SO, Y., DU-BSUB, S., JAE-KYUNG, K., JONG-HEUM, P., BEOM-SEOK, S., SANG-HYUN, P., JU-WOON, L., HYUN-JIN, P., JAE-HUN, K., EUI-BAEK, B., and EUI-HONG, B., 2013. Procyanidin dimer B2-mediated IRAK-M induction negatively regulates TLR4 signaling in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **438**: 122-128.
- NELSON, M.E., KURYATOV, A., CHOI, C.H., ZHOU, Y. and LINDSTROM, J., 2003. Alternate stoichiometries of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* **63**: 332-341.
- NUMA, S., 1986. Molecular basis for the function of ionic channels. *Biochem Soc Symp* **52**: 119-143.
- ODDO, S. and LAFERLA, F.M., 2006. The role of nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease. *J Physiol Paris* **99**: 172-179.

- PAKKANEN, J.S., STENFORS, J., JOKITALO, E. and TUOMINEN, R.K., 2006. Effect of chronic nicotine treatment on localization of neuronal nicotinic acetylcholine receptors at cellular level. *Synapse* **59**: 383-393.
- PATERSON, D. and NORDBERG, A., 2000. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog Neurobiol* **61**: 75-111.
- PAVLOV, V.A. and TRACEY, K.J., 2006. Controlling inflammation: the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Biochem Soc Trans* **34**: 1037-1040.
- PERL, O., STROUS, R.D., DRANIKOV, A., CHEN, R. and FUCHS, S., 2006. Low levels of alpha7-nicotinic acetylcholine receptor mRNA on peripheral blood lymphocytes in schizophrenia and its association with illness severity. *Neuropsychobiology* **53**: 88-93.
- RAKHILIN, S., DRISDEL, R.C., SAGHER, D., MCGEHEE, D.S., VALLEJO, Y. and GREEN, W.N., 1999. Alpha-Bungarotoxin Receptors Contain Alpha7 Subunits in Two Different Disulfide-Bonded Conformations. *J Cell Biol* **146**: 203-218.
- RAPOPORT, T.A., 1992. Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science* **258**: 931-936.
- RAUX, G., BONNET-BRILHAULT, F., LOUCHART, S., HOUY, E., GANTIER, R., LEVILLAIN, D., ALLIO, G., HAOUZIR, S., PETIT, M., MARTINEZ, M., FREBOURG, T., THIBAUT, F. and CAMPION, D., 2002. The -2 bp deletion in exon 6 of the 'alpha 7-like' nicotinic receptor subunit gene is a risk factor for the P50 sensory gating deficit. *Mol Psychiatry* **7**:1006-1011.
- REN, X.Q., CHENG, S.B., TREUIL, M.W., MUKHERJEE, J., RAO, J., BRAUNEWELL, K.H., LINDSTROM, J.M. and ANAND, R., 2005. Structural determinants of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor trafficking. *J Neurosci* **25**: 6676-6686.
- RILEY, B., WILLIAMSON, M., COLLIER, D., WILKIE, H. and MAKOFF, A., 2002. A 3-Mb map of a large Segmental duplication overlapping the alpha7-nicotinic acetylcholine receptor gene (CHRNA7) at human 15q13-q14. *Genomics* **79**: 197-209.
- ROSAS-BALLINA, M., OCHANI, M., PARRISH, W.R., OCHANI, K., HARRIS, Y.T., HUSTON, J.M., CHAVAN, S. and TRACEY, K.J., 2008. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 11008-11013.
- ROSAS-BALLINA, M., OLOFSSON, P.S., OCHANI, M., VALDES-FERRER, S.I., LEVINE, Y.A., REARDON, C., TUSCHE, M.W., PAVLOV, V.A., ANDERSSON, U., CHAVAN, S., MAK, T.W. and TRACEY, K.J., 2011. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science* **334**: 98-101.
- ROSATI, O. and MARTIN, M.U., 2002. Identification and characterization of murine IRAK-M. *Biochem Biophys Res Commun* **293**: 1472-1477.
- ROSS, A.F., GREEN, W.N., HARTMAN, D.S. and CLAUDIO, T., 1991. Efficiency of acetylcholine receptor subunit assembly and its regulation by cAMP. *J Cell Biol* **113**: 623-636.
- SAEDI, M.S., CONROY, W.G. and LINDSTROM, J., 1991. Assembly of Torpedo acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *J Cell Biol* **112**: 1007-1015.
- SALMINEN, O., DRAPEAU, J.A., MCINTOSH, J.M., COLLINS, A.C., MARKS, M.J. and GRADY, S.R., 2007. Pharmacology of alpha-conotoxin MII-sensitive subtypes of nicotinic acetylcholine receptors isolated by breeding of null mutant mice. *Mol Pharmacol* **71**:1563-1571.

- SALMINEN, O., MURPHY, K.L., MCINTOSH, J.M., DRAGO, J., MARKS, M.J., COLLINS, A.C. and GRADY, S.R., 2004. Subunit composition and pharmacology of two classes of striatal presynaptic nicotinic acetylcholine receptors mediating dopamine release in mice. *Mol Pharmacol* **65**: 1526-1535.
- SEGUELA, P., WADICHE, J., DINELEY-MILLER, K., DANI, J.A. and PATRICK, J.W., 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.
- SEN, R. and BALTIMORE, D., 1986. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* **46**: 705-716.
- SERANTES, R., ARNALICH, F., FIGUEROA, M., SALINAS, M., ANDRES-MATEOS, E., CODOCEO, R., RENART, J., MATUTE, C., CAVADA, C., CUADRADO, A. and MONTIEL, C., 2006. Interleukin-1beta enhances GABAA receptor cell-surface expression by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway: relevance to sepsis-associated encephalopathy. *J Biol Chem* **281**: 14632-14643.
- SEVERANCE, E.G., DICKERSON, F.B., STALLINGS, C.R., ORIGONI, A.E., SULLENS, A., MONSON, E.T. and YOLKEN, R.H., 2009. Differentiating nicotine- versus schizophrenia-associated decreases of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor transcript, CHRFAM7A, in peripheral blood lymphocytes. *J Neural Transm* **116**: 213-220.
- SEVERANCE, E.G. and YOLKEN, R.H., 2008. Novel alpha7 nicotinic receptor isoforms and deficient cholinergic transcription in schizophrenia. *Genes Brain Behav* **7**: 37-45.
- SEVERANCE, E.G., ZHANG, H., CRUZ, Y., PAKHLEVANIANTS, S., HADLEY, S.H., AMIN, J., WECKER, L., REED, C. and CUEVAS, J., 2004. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunit exists in two isoforms that contribute to functional ligand-gated ion channels. *Mol Pharmacol* **66**: 420-429.
- SHARMA, G. and VIJAYARAGHAVAN, S., 2008. Nicotinic receptors containing the alpha7 subunit: a model for rational drug design. *Curr Med Chem* **15**: 2921-2932.
- SHARMA, G. and VIJAYARAGHAVAN, S., 2001. Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release from intracellular stores. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 4148-4153.
- SHAW, S., BENCHERIF, M. and MARRERO, M.B., 2003. Angiotensin II blocks nicotine-mediated neuroprotection against beta-amyloid (1-42) via activation of the tyrosine phosphatase SHP-1. *J Neurosci* **23**: 11224-11228.
- SHAW, S., BENCHERIF, M. and MARRERO, M.B., 2002. Janus kinase 2, an early target of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection against Abeta-(1-42) amyloid. *J Biol Chem* **277**: 44920-44924.
- SHEN, J.X. and YAKEL, J.L., 2009. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system. *Acta Pharmacol Sin* **30**: 673-680.
- SHEN, W., STONE, K., JALES, A., LEITENBERG, D., and LADISCH, S., 2008. Inhibition of TLR activation and up-regulation of IL-1R associated kinase-M expression by exogenous gangliosides. *J Immunol* **180**: 4425-4432.
- SHIMOHAMA, S., 2009. Nicotinic receptor-mediated neuroprotection in neurodegenerative disease models. *Biol Pharm Bull* **32**: 332-336.

- SHTROM, S.S. and HALL, Z.W., 1996. Formation of a ligand-binding site for the acetylcholine receptor in vitro. *J Biol Chem* **271**: 25506-25514.
- SIMOSKY, J.K., STEVENS, K.E., ADLER, L.E. and FREEDMAN, R., 2003. Clozapine improves deficient inhibitory auditory processing in DBA/2 mice, via a nicotinic cholinergic mechanism. *Psychopharmacology* **165**: 386-396.
- SINE, S.M., 2002. The nicotinic receptor ligand binding domain. *J Neurobiol* **53**: 431-446.
- SINKUS, M.L., LEE, M.J., GAULT, J., LOGEL, J., SHORT, M., FREEDMAN, R., CHRISTIAN, S.L., LYON, J. and LEONARD, S., 2009. A 2-base pair deletion polymorphism in the partial duplication of the alpha7 nicotinic acetylcholine gene (CHRFAM7A) on chromosome 15q14 is associated with schizophrenia. *Brain Res* **1291**: 1-11.
- SMIT, A.B., SYED, N.I., SCHAAP, D., VAN MINNEN, J., KLUMPERMAN, J., KITS, K.S., LODDER, H., VAN DER SCHORS, R.C., VAN ELK, R., SORGEDRAGER, B., BREJC, K., SIXMA, T.K. and GERAERTS, W.P., 2001. A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature* **411**: 261-268.
- SOARES-SCHANOSKI, A., JURADO, T., CORDOBA, R., SILICEO, M., FRESNO, C.D., GOMEZ-PINA, V., TOLEDANO, V., VALLEJO-CREMADES, M.T., ALFONSO-INIGUEZ, S., CARBALLO-PALOS, A., FERNANDEZ-RUIZ, I., CUBILLAS-ZAPATA, C., BISWAS, S.K., ARNALICH, F., GARCIA-RIO, F. and LOPEZ-COLLAZO, E., 2012. Impaired antigen presentation and potent phagocytic activity identifying tumor-tolerant human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **423**: 331-337.
- SOBEL, A., WEBER, M. and CHANGEUX, J.P., 1977. Large-scale purification of the acetylcholine-receptor protein in its membrane-bound and detergent-extracted forms from *Torpedo marmorata* electric organ. *FEBS J* **80**: 215-224.
- SOLIS-GARRIDO, L.M., PINTADO, A.J., ANDRES-MATEOS, E., FIGUEROA, M., MATUTE, C. and MONTIEL, C., 2004. Cross-talk between native plasmalemmal Na⁺/Ca²⁺ exchanger and inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ internal store in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* **279**: 52414-52424.
- SPURDEN, D.P., COURT, J.A., LLOYD, S., OAKLEY, A., PERRY, R., PEARSON, C., PULLEN, R.G. and PERRY, E.K., 1997. Nicotinic receptor distribution in the human thalamus: autoradiographical localization of [3H]nicotine and [125I] alpha-bungarotoxin binding. *J Chem Neuroanat* **13**: 105-113.
- ST JOHN, P.A., 2009. Cellular trafficking of nicotinic acetylcholine receptors. *Acta Pharmacol Sin* **30**(6), pp. 656-662.
- SU, J., ZHANG, T., TYSON, J. and LI, L., 2009. The interleukin-1 receptor-associated kinase M selectively inhibits the alternative, instead of the classical NFkappaB pathway. *J Innate Immun* **1**: 164-174.
- SU, Z., WANG, J., YU, J., HUANG, X. and GU, X., 2006. Evolution of alternative splicing after gene duplication. *Genome Res* **16**: 182-189.
- SWEILEH, W., WENBERG, K., XU, J., FORSAYETH, J., HARDY, S. and LORING, R.H., 2000. Multistep expression and assembly of neuronal nicotinic receptors is both host-cell- and receptor-subtype-dependent. *Brain Res* **75**: 293-302.
- TAKADA, Y., YONEZAWA, A., KUME, T., KATSUKI, H., KANEKO, S., SUGIMOTO, H. and AKAIKE, A., 2003. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection by donepezil against glutamate neurotoxicity in rat cortical neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **306**: 772-777.

- TAKAHASHI, T., KUNO, M., MISHINA, M. and NUMA, S., 1985. A physiological study on acetylcholine receptor expressed in *Xenopus* oocytes from cloned cDNAs. *J Physiol* **80**: 229-232.
- TAKEDA, K., CLAUSEN, B.E., KAISHO, T., TSUJIMURA, T., TERADA, N., FORSTER, I. and AKIRA, S., 1999. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* **10**: 39-49.
- TALY, A., CORRINGER, P.J., GUEDIN, D., LESTAGE, P. and CHANGEUX, J.P., 2009. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov* **8**: 733-750.
- TASKE, N.L., WILLIAMSON, M.P., MAKOFF, A., BATE, L., CURTIS, D., KERR, M., KJELDSSEN, M.J., PANG, K.A., SUNDQVIST, A., FRIIS, M.L., CHADWICK, D., RICHENS, A., COVANIS, A., SANTOS, M., ARZIMANOGLU, A., PANAYIOTOPOULOS, C.P., WHITEHOUSE, W.P., REES, M. and GARDINER, R.M., 2002. Evaluation of the positional candidate gene *CHRNA7* at the juvenile myoclonic epilepsy locus (EJM2) on chromosome 15q13-14. *Epilepsy Res* **49**: 157-172.
- TEMBURNI, M.K., BLITZBLAU, R.C. and JACOB, M.H., 2000. Receptor targeting and heterogeneity at interneuronal nicotinic cholinergic synapses in vivo. *J Physiol* **525**: 21-29.
- THE, F.O., BOECKXSTAENS, G.E., SNOEK, S.A., CASH, J.L., BENNINK, R., LAROSA G.J., van den WIJNGAARD, R.M., GREAVES, D.R., and DE JONGE, W.J., 2007. Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway ameliorates postoperative ileus in mice. *Gastroenterology* **133**: 1219-1228.
- The ENCODE Project Consortium, 2011. A users guide to the Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE). *Plos Biol* **9**.
- TRACEY, K.J., 2009. Reflex control of immunity. *Nat Rev Immunol* **9**: 418-428.
- TRACEY, K.J., 2007. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Clin Invest* **117**: 289-296.
- TRACEY, K.J., 2005. Fat meets the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Exp Med* **202**: 1017-1021.
- TREININ, M., 2008. RIC-3 and nicotinic acetylcholine receptors: biogenesis, properties, and diversity. *Biotechnol J* **3**: 1539-1547.
- TSOYI, K., JANG, H.J., KIM, J.W., CHANG, H.K., LEE, Y.S., PAE, H.O., KIM, H.J., SEO, H.G., LEE, J.H., CHUNG, H.T. and CHANG, K.C., 2011. Stimulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor by nicotine attenuates inflammatory response in macrophages and improves survival in experimental model of sepsis through heme oxygenase-1 induction. *Antiox Redox Signal* **14**: 2057-2070.
- TSUNEKI, H., SALAS, R. and DANI, J.A., 2003. Mouse muscle denervation increases expression of an alpha7 nicotinic receptor with unusual pharmacology. *J Physiol* **547**: 169-179.
- TYAGI, E., AGRAWAL, R., NATH, C. and SHUKLA, R., 2010. Cholinergic protection via alpha7 nicotinic acetylcholine receptors and PI3K-Akt pathway in LPS-induced neuroinflammation. *Neurochem Int* **56**: 135-142.
- ULLOA, L., 2013. The cholinergic anti-inflammatory pathway meets microRNA. *Cell Res* **23**: 1249-1250 .
- VALLES, A.S. and BARRANTES, F.J., 2012. Chaperoning alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochim Biophys Acta* **1818**: 718-729.

- VALLES, A.S., ROCCAMO, A.M. and BARRANTES, F.J., 2009. Ric-3 chaperone-mediated stable cell-surface expression of the neuronal alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in mammalian cells. *Acta Pharmacol Sin* **30**: 818-827.
- VAN DER ZANDEN, E.P., BOECKXSTAENS, G.E. and DE JONGE, W.J., 2009. The vagus nerve as a modulator of intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil* **21**: 6-17.
- VAN DER ZANDEN, E.P., HILBERS, F.W., VERSEIJDEN, C., VAN DEN WIJNGAARD, R.M., SKYNNER, M., LEE, K., ULLOA, L., BOECKXSTAENS, G.E., AND DE JONGE, W.J., 2012. Nicotinic acetylcholine receptor expression and susceptibility to cholinergic immunomodulation in human monocytes of smoking individuals. *Neuroimmunomodulation* **19**: 255-265.
- VAN DER ZANDEN, E.P., SNOEK, S.A., HEINSBROEK, S.E., STANISOR, O.I., VERSEIJDEN, C., BOECKXSTAENS, G.E., PEPPELENBOSCH, M.P., GREAVES, D.R., GORDON, S. and DE JONGE, W.J., 2009. Vagus nerve activity augments intestinal macrophage phagocytosis via nicotinic acetylcholine receptor alpha4beta2. *Gastroenterology* **137**: 1029-1039.
- VAN MAANEN, M.A., STOOF, S.P., VAN DER ZANDEN, E.P., DE JONGE, W.J., JANSSEN, R.A., FISCHER, D.F., VANDEGHINSTE, N., BRYNS, R., VERVOORDELDONK, M.J. and TAK, P.P., 2009. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor on fibroblast-like synoviocytes and in synovial tissue from rheumatoid arthritis patients: a possible role for a key neurotransmitter in synovial inflammation. *Arthritis Rheum* **60**: 1272-1281.
- VAN WESTERLOO, D.J., GIEBELEN, I.A., FLORQUIN, S., BRUNO, M.J., LAROSA, G.J., ULLOA, L., TRACEY, K.J. and VAN DER POLL, T., 2006. The vagus nerve and nicotinic receptors modulate experimental pancreatitis severity in mice. *Gastroenterology* **130**: 1822-1830.
- VILLIGER, Y., SZANTO, I., JACONI, S., BLANCHET, C., BUISSON, B., KRAUSE, K.H., BERTRAND, D. and ROMAND, J.A., 2002. Expression of an alpha7 duplicate nicotinic acetylcholine receptor-related protein in human leukocytes. *J Neuroimmunol* **126**: 86-98.
- VOGT, P.K. and HART, J.R., 2011. PI3K and STAT3: a new alliance. *Cancer Discov* **1**: 481-486.
- WANAMAKER, C.P., CHRISTIANSON, J.C. and GREEN, W.N., 2003. Regulation of nicotinic acetylcholine receptor assembly. *Ann NY Acad Sci* **998**: 66-80.
- WANG, H., LIAO, H., OCHANI, M., JUSTINIANI, M., LIN, X., YANG, L., AL-ABED, Y., WANG, H., METZ, C., MILLER, E.J., TRACEY, K.J., ULLOA, L., 2004. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat Med* **10**: 1216-1221.
- WANG, H., YU, M., OCHANI, M., AMELLA, C.A., TANOVIC, M., SUSARLA, S., LI, J.H., WANG, H., YANG, H., ULLOA, L., AL-ABED, Y., CZURA, C.J. and TRACEY, K.J., 2003. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* **421**: 384-388.
- WESCHE, H., GAO, X., LI, X., KIRSCHNING, C.J., STARK, G.R. and CAO, Z., 1999. IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *J Biol Chem* **274**: 19403-19410.
- WEVERS, A., JESKE, A., LOBRON, C., BIRTSCH, C., HEINEMANN, S., MAELICKE, A., SCHRODER, R. and SCHRODER, H., 1994. Cellular distribution of nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs in the human cerebral cortex as revealed by non-isotopic in situ hybridization. *Brain Res* **25**: 122-128.

- YOSHIDA, Y., KUMAR, A., KOYAMA, Y., PENG, H., ARMAN, A., BOCH, J.A. and AURON, P.E., 2004. Interleukin 1 activates STAT3/nuclear factor-kappaB cross-talk via a unique TRAF6- and p65-dependent mechanism. *J Biol Chem* **279**: 1768-1776.
- YOSHIKAWA, H., KUROKAWA, M., OZAKI, N., NARA, K., ATOU, K., TAKADA, E., KAMOCHI, H. and SUZUKI, N., 2006. Nicotine inhibits the production of proinflammatory mediators in human monocytes by suppression of I-kappaB phosphorylation and nuclear factor-kappaB transcriptional activity through nicotinic acetylcholine receptor alpha7. *Clin Exp Immunol* **146**: 116-123.
- YU, C.R. and ROLE, L.W., 1998. Functional contribution of the alpha7 subunit to multiple subtypes of nicotinic receptors in embryonic chick sympathetic neurones. *J Physiol* **509**: 651-665.
- ZHANG, J. and BERG, D.K., 2007. Reversible inhibition of GABAA receptors by alpha7-containing nicotinic receptors on the vertebrate postsynaptic neurons. *J Physiol* **579**: 753-763.
- ZHAO-SHEA, R., LIU, L., SOLL, L.G., IMPROGO, M.R., MEYERS, E.E., MCINTOSH, J.M., GRADY, S.R., MARKS, M.J., GARDNER, P.D. and TAPPER, A.R., 2011. Nicotine-mediated activation of dopaminergic neurons in distinct regions of the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacology* **36**: 1021-1032.
- ZODY, M.C., GARBER, M., SHARPE, T., YOUNG, S.K., ROWEN, L., O'NEILL, K., WHITTAKER, C.A., KAMAL, M., CHANG, J.L., CUOMO, C.A., DEWAR, K., FITZGERALD, M.G., KODIRA, C.D., MADAN, A., QIN, S., YANG, X., ABBASI, N., ABOUELLEIL, A., ARACHCHI, H.M., BARADARANI, L., BIRDITT, B., BLOOM, S., BLOOM, T., BOROWSKY, M.L., BURKE, J., BUTLER, J., COOK, A., DEARELLANO, K., DECAPRIO, D., DORRIS, L., 3rd, DORS, M., EICHLER, E.E., ENGELS, R., FAHEY, J., FLEETWOOD, P., FRIEDMAN, C., GEARIN, G., HALL, J.L., HENSLEY, G., JOHNSON, E., JONES, C., KAMAT, A., KAUR, A., LOCKE, D.P., MADAN, A., MUNSON, G., JAFFE, D.B., LUI, A., MACDONALD, P., MAUCELI, E., NAYLOR, J.W., NESBITT, R., NICOL, R., O'LEARY, S.B., RATCLIFFE, A., ROUNSLEY, S., SHE, X., SNEDDON, K.M., STEWART, S., SOUGNEZ, C., STONE, S.M., TOPHAM, K., VINCENT, D., WANG, S., ZIMMER, A.R., BIRREN, B.W., HOOD, L., LANDER, E.S. and NUSBAUM, C., 2006. Analysis of the DNA sequence and duplication history of human chromosome 15. *Nature* **440**: 671-675.
- ZACHARIOUDAKI, V., ANDROULIDAKI, A., ARRANZ, A., VRENTZOS, G., MARGIORIS, A.N., and TSATSANIS, C., 2009. Adiponectin promotes endotoxin tolerance in macrophages by inducing IRAK-M expression. *J Immunol* **182**: 6444-6451.
- ZOURIDAKIS, M., ZISIMOPOULOU, P., POULAS, K. and TZARTOS, S.J., 2009. Recent advances in understanding the structure of nicotinic acetylcholine receptors. *IUBMB Life* **61**: 407-423.
- ZWART, R. and VIJVERBERG, H.P., 1998. Four pharmacologically distinct subtypes of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Pharmacol* **54**: 1124-1131.