

Carrera de Bioquímica
Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia-UNS

Práctica de Investigación Bioquímica (optativa)

Código de la Materia: 1346
Carga horaria: 50 horas

Profesor –Investigador: Silvia Antolini
Asistente/Ayudante de docencia: Daniel Alejandro Peñalva

Asignatura (s) Obligatoria (s) Aprobada /Cursada(s): Bioanalítica II (Cursada), Química Biológica I (Aprobada)

Lugar de Trabajo Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca

Título del Proyecto de Investigación Acreditado: Factores extrínsecos condicionantes de la función del receptor de acetilcolina nicotínico: relevancia fisiológica y patológica

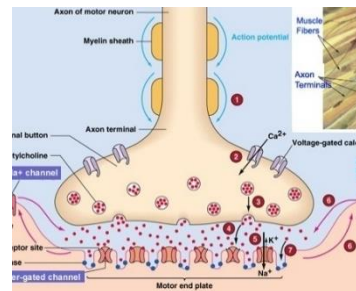
Código Proyecto: PGI 24/B282 (actualmente en evaluación un nuevo PGI)

Resumen del Proyecto

El receptor de acetilcolina nicotínico (nAChR) es el responsable de desencadenar la contracción muscular, y en el sistema nervioso central participa en los procesos cognitivos, de la memoria, de la audición, etc. Asimismo, alteraciones en la función y en la estructura del nAChR han sido reportadas en patologías tales como Miastenia Gravis, epilepsias hereditarias, Enfermedad de Alzheimer (EA), entre otras. El nAChR es una proteína integral de membrana, y la unión del neurotransmisor acetilcolina en su parte extramembrana conduce a una cascada de cambios conformacionales que finalizan a nivel transmembrana en la apertura de un canal iónico intrínseco y la consiguiente depolarización de la membrana. Se considera que la íntima relación del nAChR con la membrana, en particular con los lípidos que la forman y las características biofísicas particulares que le confieren, son fundamentales para su correcto funcionamiento. Cambios en la composición lipídica de la membrana ocurren a lo largo de la vida, y perturbaciones a estos cambios se registran en determinadas patologías, como en la EA, asignándole un rol fundamental a la membrana en la fisiopatología de la misma. En la ejecución de esta práctica de investigación se profundizará en las bases moleculares aún no conocidas de la fisiología del nAChR en relación con los lípidos de la membrana y el impacto de las perturbaciones lipídicas descritas en la EA. Así, se propone estudiar el efecto de las propiedades de las membranas sobre la conformación, distribución y función del nAChR empleando distintos sistemas modelo

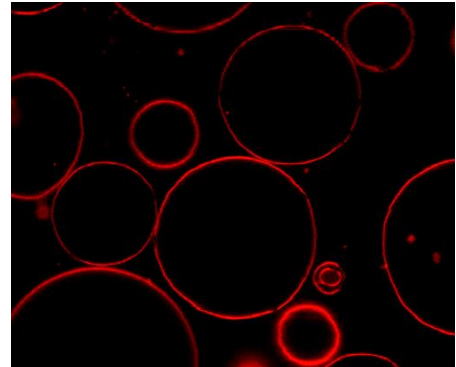
Plan de trabajo

En esta práctica se propone avanzar en la comprensión de las bases moleculares de la modulación de los receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChR) a nivel transmembrana, y del impacto de perturbaciones en la composición/organización en situaciones fisiopatológicas, en particular en las condiciones descritas en la Enfermedad de Alzheimer (EA). El nAChR pertenece a la superfamilia de canales iónicos activados por ligando, cuya característica particular es la rápida transducción de una señal química (ligando/agonista) en una señal eléctrica (despolarización de la membrana postsináptica). Es una proteína transmembrana compuesta por cuatro subunidades distintas con una estequiometría pentamérica que requiere de un entorno lipídico apropiado para su buen funcionamiento. Entonces, surge el interrogante de cómo influye la membrana, con sus lípidos particulares y sus asimetrías, en el acoplamiento/desacoplamiento entre



los dominios de unión de agonista y poro del canal del nAChR y en su localización en dominios lipídicos particulares. Además, teniendo en cuenta la reciente relación postulada entre cambios en la composición lipídica de la membrana, con una pérdida de asimetrías, en la EA, se estudiarán condiciones de membrana que simulen las perturbaciones descritas en esta patología. Se espera que los resultados obtenidos ayuden a esclarecer las condiciones necesarias para potenciar la señalización colinérgica en la EA y/o patologías semejantes.

Objetivo General a desarrollar durante el desarrollo de esta asignatura. Identificar factores de membrana que actuando a nivel del dominio transmembrana del nAChR modulen la función. Conociendo que la distribución, función y conformación del nAChR están condicionadas por señales provenientes de la membrana celular, tales como su composición y asimetría lateral y transversal, se realizarán estudios en sistemas modelo con una composición lipídica tal que simule condiciones fisiológicas o condiciones fisiopatológicas (EA). Se prepararán diferentes sistemas modelo, con incorporación del nAChR purificado previamente. Se realizarán estudios de espectroscopía de fluorescencia para correlacionar el estado conformacional del nAChR frente a las diferentes condiciones de membrana, paralelamente a estudiar las propias condiciones biofísicas de dichas membranas; y de microscopía confocal para develar la distribución del nAChR en las diferentes condiciones estudiadas (en la imagen se muestra una imagen de microscopía confocal de liposomas unilamelares gigantes (GUVs), como ejemplo de los experimentos a realizar).



Descripción de las Actividades a realizar

Purificación del nAChR de órganos de *Torpedo californica* por fraccionamiento subcelular y columnas de afinidad y reconstitución en liposomas unilamelares grandes (LUVs, large unilamellar vesicles) mediante diálisis y gigantes (GUVs, giant unilamellar vesicles) mediante electroformación, con diferentes composiciones de lípidos. Generación posterior de asimetrías transbicapa recurriendo a diferentes estrategias tales como partición de determinados lípidos y/o exposición de los liposomas a determinadas enzimas hidrolíticas y/u oxidativas. Visualización de la distribución del nAChR en dominios de membrana por microscopía confocal. Estudio de la conformación del nAChR y de las propiedades biofísicas de la membrana por espectroscopía de fluorescencia.

Cuatrimestre: Primero

Cupo de alumnos: 2

Carga horaria semanal: 1 día por semana

Modalidad de Evaluación:

- Entrega de un informe con formato de trabajo científico
- Exposición Oral: *Se realizará en presencia de todos los alumnos de la materia y los profesores respectivos y al menos un integrante de la CCB (hasta 15 minutos)*