



Doctoral Thesis

## Functional regulation of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor by protein interactions and tyrosine phosphorylation

**Author(s):**

Wiesner, Andreas

**Publication Date:**

2006

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005215223> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Doctoral Thesis ETH No. 16636

**Functional regulation of the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine  
receptor by protein interactions and tyrosine  
phosphorylation**

A dissertation submitted to the

**SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH**

for the degree of  
Doctor of Sciences

presented by

**Andreas Wiesner**

Dipl. Biol., Universität Ulm  
born 27.12.1976  
citizen of Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Christian Fuhrer, supervisor & co-examiner

Prof. Dr. Martin E. Schwab, examiner

Prof. Dr. Lukas Sommer, co-examiner

2006

---

## Summary

The communication between cells is the most important task that has to be fulfilled to make a complex organ such as the central nervous system (CNS) work. A break in communication between two cells is avoided by a complex machinery of transmission. The gap is bridged by the release of a broad variety of neurotransmitters specialised for different synapses in the CNS. To pick up the information and pass it on to the post-synaptic cell receptors recognise the neurotransmitters and trigger signalling pathways in their host cell. Many different receptors have evolved to fulfil a specific task at a specific site in the brain. Variations of these receptors include type of agonist, agonist affinity, protein binding sites and localisation. The subfamily of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) is widely distributed over the CNS and its members play various roles in different regions. The most prominent homomeric member is the  $\alpha 7$ nAChR. The highest concentration of the  $\alpha 7$ nAChR is found in the hippocampal formation but it is widely distributed all over the brain. It is highly permeable to sodium and calcium and a fast-desensitising receptor. This renders it powerful in the regulation and triggering of calcium dependent signalling pathways. The role of the  $\alpha 7$ nAChR is diverse. It can serve as major receptor for neurotransmission, for example in the cholinergic transmission found at the interneurons in the hippocampus that receive cholinergic innervation from the medial septum-diagonal band complex of the basal forebrain. But it was also shown to influence transmitter release at pre-synaptic sites. Interestingly, the receptor is also found in post-synaptic localisation but excluded from the post-synaptic density (PSD). Here, a modulatory role of  $\alpha 7$ nAChR was postulated. Some of these modulatory roles influence important mechanisms in the brain. It was shown that activation of  $\alpha 7$ nAChR on CA1 pyramidal neurons of the hippocampus, upon co-stimulation of the Schaeffer collaterals, can facilitate induction of long-term potentiation (LTP). Activation of  $\alpha 7$ nAChRs can also decide about cell survival and cell death. Very recently data were presented that proposed an important role of  $\alpha 7$ nAChRs in Alzheimer's Disease (AD): it was found that a pathological form of amyloid $\beta$  binds to the  $\alpha 7$ nAChR and thereby induces endocytosis of NMDA-receptors, which could underlie the cognitive deficits in AD. Even though several cellular mechanisms are identified in which  $\alpha 7$ nAChRs seem to play a role it is hardly understood how the receptor itself is regulated.

This study focuses on the discovery of interaction partners of the  $\alpha 7$ nAChR, and we aim to understand the regulation of the  $\alpha 7$ nAChR. So far several signalling pathways are discovered that involve the  $\alpha 7$ nAChR but there is hardly any mechanism known that regulates the

---

---

activity, the transport or the clustering of the receptor. In chapter II we investigate Src-family kinases (SFks) as possible interaction partners for the  $\alpha 7$ nAChR. SFks have been previously implicated in many signalling pathways which also include the  $\alpha 7$ nAChR, such as LTP or neuroprotection. In co-precipitations we could show a direct binding of SFks to the  $\alpha 7$ nAChR. We could also demonstrate that SFks can phosphorylate tyrosines in the cytoplasmic loop of the receptor. Furthermore, tyrosine-phosphorylation of the cytoplasmic loop of the  $\alpha 7$ nAChR leads to a reduced calcium ion influx in heterologous systems (frog oocytes) as well as homologous cells (hippocampal slices and neuroblastoma cells). This reduced  $\alpha 7$ nAChR activity seems to be mainly due to changes in properties of surface receptors and only to a minor degree due to endocytosis or reduced surface expression of the receptor.

To examine if SFks have an influence on the  $\alpha 7$ nAChR distribution we used dissociated hippocampal cells as described in chapter III. We found no changes in the amount or clustering of surface receptors upon treatment with Src-inhibitors or phosphatase inhibitors. A tyrosine-mutant of the receptor lacking the phosphorylation sites introduced into dissociated hippocampal cells displayed no change in receptor distribution compared to a wild-type construct.

In chapter IV we identified another protein interacting with the  $\alpha 7$ nAChR. The protein binding to protein kinase C (PICK1) was found to directly bind to the  $\alpha 7$ nAChR. In immunostaining experiments we could show that PICK1 negatively regulates the presence of the receptor in clusters on the surface of hippocampal neurons. This negative influence seems to be restricted to interneurons and could be a host-cell specific mechanism to regulate surface expression and/or clustering of the  $\alpha 7$ nAChR.

Taken together the results from this thesis identify new mechanisms and interaction partners involved in the regulation of the  $\alpha 7$ nAChR – both at the level of receptor activity and receptor clustering. The results improve our understanding of how the  $\alpha 7$ nAChR may act at different sites in different ways and influence the signalling pathways involved in neuroprotection, LTP and AD.

---

---

## Zusammenfassung

Kommunikation zwischen Zellen ist die grösste Herausforderung, die bewältigt werden muss, damit ein komplexes Organ wie das Zentral-Nervensystem (ZNS) funktioniert. Eine Unterbrechung dieser Kommunikation zwischen zwei Zellen wird durch eine komplexe Übertragungsmaschinerie vermieden. Die Lücke wird durch die Ausschüttung von unterschiedlichen Neurotransmittern überbrückt, die für verschiedene Synapsen im ZNS spezialisiert sind. Um diese Nachricht wahr zu nehmen und sie an die postsynaptische Zelle weiter zu leiten, gibt es Rezeptoren, welche die Neurotransmitter erkennen und elektrochemische Signale in der Zelle auslösen. Abhängig von der Region, in der sich die Zellen befinden, und vom Zelltyp selbst haben sich unterschiedlichste Rezeptoren mit unterschiedlichen Eigenschaften, bezüglich Agonisten-Affinität, Interaktionsproteinen und Lokalisierung auf der Zelle, herausgebildet. Die Unterfamilie der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChRs) ist über das ganze ZNS verteilt und ihre Mitglieder haben unterschiedliche Funktionen in unterschiedlichen Bereichen. Das wichtigste homomere Mitglied dieser Familie ist der  $\alpha 7$ nAChR. Die grösste Ansammlung von  $\alpha 7$ nAChR findet sich im Hippocampus, aber der Rezeptor ist auch in vielen anderen Regionen des Gehirns präsent. Er besitzt eine hohe Durchlässigkeit für Natrium- und Kalzium-Ionen und desensitisiert äusserst schnell. Aufgrund dieser Eigenschaften kann er grossen Einfluss auf die Regulierung von kalziumabhängigen Signalkaskaden nehmen. Die Rolle des  $\alpha 7$ nAChRs kann ganz unterschiedlich sein. In den Interneuronen des Hippocampus dient er als primärer Neurotransmitter-Rezeptor, um cholinerge Signale aus dem basalen Vorhirn über den medialen Septum-diagonal Band Komplex zu übermitteln. Allerdings kann der  $\alpha 7$ nAChR auch die Ausschüttung von Transmitter beeinflussen wenn er präsynaptisch lokalisiert ist. Interessanterweise wurde der Rezeptor auch postsynaptisch gefunden, wo er allerdings oft nicht unmittelbar in der postsynaptischen Dichte (PSD) liegt. Hier moduliert er vermutlich die Übertragung des Signals durch die Hauptrezeptoren auf die postsynaptische Zelle. Dadurch kann er Einfluss auf wichtige Prozesse im Hirn nehmen. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass durch eine Aktivierung von  $\alpha 7$ nAChRen auf hippocampalen Pyramidalzellen der CA1-Region in Kostimulation mit den Schaeffer-Kollateralen eine lang anhaltende Potenzierung des Ausgangssignals dieser Zelle (LTP) vereinfacht induziert werden kann. Auch kann die Aktivierung der  $\alpha 7$ nAChRen über Zelltod oder Zellerhalt bestimmen. Darüber hinaus konnte kürzlich postuliert werden, dass dem  $\alpha 7$ nAChR wahrscheinlich eine wichtige Rolle in den pathologischen Vorgängen der Alzheimer Krankheit (AD) zukommt. Pathologisches

---

---

Amyloid $\beta$  bindet an  $\alpha 7$ nAChRn und leitet dadurch die Endocytose von NMDA-Rezeptoren ein, was einen wichtigen Beitrag zur Reduktion der kognitiven Funktionen in AD leisten könnte. Obwohl verschiedene Mechanismen in der Zelle identifiziert wurden, an denen der  $\alpha 7$ nAChR beteiligt ist, fehlen noch viele Hinweise darauf, wie er selbst reguliert wird.

Diese Doktorarbeit befasst sich mit der Entdeckung von Interaktionspartnern des  $\alpha 7$ nAChRs. Wir bezwecken ein besseres Verständnis der Regulation des  $\alpha 7$ nAChRs. Bisher konnten verschiedene kalziuminduzierte Signalwege entdeckt werden, die vom  $\alpha 7$ nAChR abhängig sind, doch es sind keine Mechanismen bekannt, welche die Aktivität, den Transport oder die Konzentrierung von  $\alpha 7$ nAChR an bestimmten Stellen der Membran bestimmen. In Kapitel II betrachten wir die Familie der Src-Kinasen (SFKen) als potentielle Interaktionspartner für den  $\alpha 7$ nAChR. Funktionen für die SFKen wurden bisher in vielen zellulären Vorgängen gefunden, in denen auch der  $\alpha 7$ nAChR eine Rolle spielt, wie zum Beispiel LTP oder Neuroprotektion. In Kopräzipitationen konnten wir eine direkte Bindung von SFKen an den  $\alpha 7$ nAChR nachweisen. Wir konnten ausserdem zeigen, dass SFKen Tyrosine in der cytoplasmatischen Schlaufe des Rezeptors phosphorylieren können. Darüber hinaus führt die  $\alpha 7$ nAChR Tyrosin-Phosphorylierung in heterologen (Frosch-Oozyten) wie auch homologen (Hippocampus-Schnitte und Neuroblastoma-Zellen) Systemen zu einem reduzierten Einstrom von Kalzium-Ionen. Diese reduzierte  $\alpha 7$ nAChR Aktivität scheint vor allem aufgrund von Veränderungen der Oberflächen-Rezeptoren zu erfolgen und weniger aufgrund von Endocytose des Rezeptors oder reduzierter Oberflächenexpression.

Um festzustellen, ob SFKen auch einen Einfluss auf die Verteilung der Rezeptorkanäle nehmen, haben wir, wie in Kapitel III beschrieben, dissoziierte Hippocampuszellkulturen verwendet. Wir haben keine Veränderung in der Menge an Rezeptor an der Zelloberfläche oder auch in der Verteilung feststellen können, nachdem wir diese Zellen mit SFK-Inhibitoren oder Phosphatase-Inhibitoren behandelt hatten. Eine Tyrosin-Mutante des Rezeptors, die keine möglichen Phosphorylierungsstellen für SFKen mehr aufweist, unterschied sich nicht vom Wildtyp hinsichtlich Menge oder Verteilung auf der Oberfläche der exprimierenden Neuronen.

In Kapitel IV haben wir einen weiteren Interaktionspartner des  $\alpha 7$ nAChRs identifiziert. Das Protein, welches an Proteinkinase C bindet, (PICK1) bindet auch unmittelbar an den  $\alpha 7$ nAChR. Durch Immunofärbungen konnten wir zeigen, wie sich PICK1 negativ auf die Expression von  $\alpha 7$ nAChR in Aggregaten an der Zelloberfläche auswirkt. Dieser negative Einfluss scheint auf Interneurone beschränkt zu sein und könnte einen zellspezifischen

---

---

Mechanismus darstellen, um Akkumulation oder Oberflächenexpression des  $\alpha 7$ nAChRs zu regulieren.

Zusammenfassend charakterisiert diese Arbeit neue Regulationsmechanismen und Interaktionspartner des  $\alpha 7$ nAChRs –für Rezeptoraktivität und -akkumulation. Die Resultate dienen dem besseren Verständnis, wie der  $\alpha 7$ nAChR unterschiedliche Funktionen an unterschiedlichen Stellen erfüllt und dadurch Neuroprotektion, synaptische Plastizität und AD beeinflussen könnte.