



Contribution of Pannexin 1 channel to AMPA receptor trafficking in a murine model of Alzheimer's disease.

Tesis entregada a

LA UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO

en Cumplimiento Parcial de los requisitos para optar al grado de

Doctor en Ciencias con Mención en Neurociencia, Facultad De

Ciencias

Por

Javiera Constanza Illanes González

Febrero 2025

Dirigida por: Dr. Álvaro Ardiles Araya

Co-Dirigida por: Dr. Pablo Muñoz

## INDEX

DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTOS	3
FINNANCIAL SUPPORT	5
INDEX	6
LIST OF TABLES	8
LIST OF FIGURES	9
ABBREVIATIONS OR NOMENCLATURE	11
RESUMEN	14
ABSTRACT	16
INTRODUCTION	17
1. Alzheimer's Disease	17
1.1 Glutamate- dependent synaptic plasticity and AMPAR trafficking in Alzheimer's Disease	19
2. Pannexin 1 channel	23
2.1 Pannexin 1 channel: structure and function	23
2.2 Panx1 channel in the central nervous system	25
2.3 Panx1 and synaptic plasticity	26
2.4 Panx1 and Alzheimer's disease	28
HYPOTHESIS	29
GENERAL AIM	30
SPECIFIC AIMS	31
METHODS	32
1. Animals	32
2. Genotyping	32
3. Primary hippocampal neuron culture	33
4. Drugs and treatments	34
5. Dye uptake	35
6. ATP	35
7. GluR1 trafficking	35
8. Immunofluorescence	36
9. Fluoro Jade staining	37
10. Neuronal measurements	37

11. Data Representation & Statistics	37
RESULTS	39
1. APP/PS1 hippocampal neurons exhibit high expression, activity, and phosphorylation in the Y308 residue of the Panx1 channel compared to WT neurons.	40
2. Blocking the Panx channel 1 with Probenecid results in changes in the expression of vesicular glutamate transporter 1 (VGluT1) and GluR1 subunit in APP/PS1 hippocampal neurons	46
3. PBN incubation increases the insertion of GluR1 in the surface of APP/PS1 and WT neurites.	51
4. PBN incubation increases actin filaments and protrusions in APP/PS1 neurons.	54
DISCUSSION	57
CONCLUSIONS	67
SUPPLEMENTARY FIGURES	68
SUPPLEMENTAL TABLES	75
REFERENCES	78

## LIST OF TABLES

### SUPPLEMENTARY TABLES:

<b>Table S1.</b> Experimental N and statistics of Figure 9	75
<b>Table S2.</b> Experimental N and statistics of Figure 10	75
<b>Table S3.</b> Experimental N and statistics of Figure 11	76
<b>Table S4.</b> Experimental N and statistics of Figure 12	76
<b>Table S5.</b> Experimental N and statistics of Figure 13	76
<b>Table S6.</b> Experimental N and statistics of Figure 14	77
<b>Table S7.</b> Experimental N and statistics of Figure 15	77

## LIST OF FIGURES

### FIGURES:

<b>Figure 1:</b> Alzheimer's disease brain. _____	18
<b>Figure 2:</b> AMPAR changes mediate excitatory synaptic plasticity. _____	19
<b>Figure 3:</b> Structure of AMPAR. _____	20
<b>Figure 4:</b> AMPAR insertion into the postsynaptic membrane. _____	22
<b>Figure 5:</b> Activity and Regulation of Panx1 _____	24
<b>Figure 6:</b> Panx1 function in the CNS _____	26
<b>Figure 7:</b> Potential mechanisms of the Panx1 channel's contribution to the excitatory synaptic plasticity _____	27
<b>Figure 8:</b> APP/PS1 hippocampal neurons at DIV 14 show neurogenerative signs_ _____	39
<b>Figure 9:</b> APP/PS1 neurons exhibit higher expression of Panx1 channel _____	41
<b>Figure 10:</b> APP/PS1 neurons display higher Panx1 activity. _____	43
<b>Figure 11:</b> The Panx1 increased activity implies phosphorylation in the Y308 residue _____	45
<b>Figure 12:</b> Panx1 blockade with PBN increases glutamatergic vesicles in APP/PS1 neurites _____	47
<b>Figure 13:</b> PBN incubation increases GluR1 receptors in APP/PS1 neurites. _____	50
<b>Figure 14:</b> Probenecid incubation increases the GluR1 in the surface in APP/PS1 and WT neurites _____	53
<b>Figure 15:</b> Panx1 blockade with PBN increase F-actin content and density of protrusions in APP/PS1 neurons. _____	55

SUPPLEMENTARY FIGURES:

<b>Figure S1:</b> Experimental design.	68
<b>Figure S2:</b> Representative images of primary hippocampal neuron cultured at 14 DIV	69
<b>Figure S3:</b> Activity of Panx1.	71
<b>Figure S4:</b> Predictive phosphorylation sites of Panx1.	72
<b>Figure S5:</b> Probenecid incubation tends to increase phosphorylation in GluR1 in S-831 residue in APP/PS1 neurons	73
<b>Figure S6:</b> The chronic treatment with PBN in APP/PS1 old mice increases GluR1 signal in hippocampus	74

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo que afecta principalmente a las personas mayores y se caracteriza por deficiencias en la memoria y el aprendizaje. Estos déficits se atribuyen en parte a la reducción de la plasticidad sináptica (PS), asociada a alteraciones en diversas vías de neurotransmisión, entre ellas la glutamatérgica, la cual presenta una disminución en la liberación de glutamato y en la expresión de los receptores de glutamato AMPA (AMPA), en particular la subunidad GluR1, que se correlaciona con los procesos de memoria.

La panexina 1 (Panx1), una proteína transmembrana, ha sido implicada en los procesos de memoria y en la PS del hipocampo. Curiosamente, se ha observado un aumento de la expresión y la actividad de la proteína Panx1 en el hipocampo de un modelo murino adulto amiloidogénico de la EA (APP/PS1) a través de un mecanismo aún no descrito. Además, el bloqueo agudo de Panx1 con probenecid (PBN), un medicamento aprobado por la FDA para la enfermedad de gota, restaura la PS del hipocampo en ratones APP/PS1 a niveles normales en comparación con los de tipo salvaje (wild type, WT). Sin embargo, el papel específico de Panx1 en la señalización glutamatérgica mediada por AMPARs en este modelo de EA sigue sin estar claro.

Este estudio investigó el papel de Panx1 en la expresión y el posicionamiento de GluR1, una subunidad de AMPAR en las neuronas del hipocampo de ratones APP/PS1 postnatales cultivadas al DIV 14. Nuestros hallazgos demuestran una elevada expresión y actividad de Panx1 por fosforilación en el residuo aminoacídico tirosina 308 en neuronas APP/PS1 en comparación con el WT en condiciones de reposo. Además, la actividad de Panx1 fue modulada por inductores de PS. En particular, el tratamiento con PBN aumentó la

expresión y la densidad de vesículas glutamatérgicas y GluR1 en las neuronas APP/PS1, lo que sugiere que Panx1 regula los elementos glutamatérgicos presinápticos y postsinápticos. Además, el bloqueo de Panx1 mejoró la inserción en la membrana basal de los AMPAR que contienen GluR1. Estos hallazgos revelan un nuevo papel de los canales de Panx1 en la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer y sugieren que la intervención de la actividad Panx1 podría proporcionar una nueva estrategia terapéutica.