

Tesis de Posgrado

Caracterización farmacológica y estudio de la relación estructura - Función del receptor nicotínico alfa 9

Verbitsky, Miguel

2001

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

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

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

Cita tipo APA:

Verbitsky, Miguel. (2001). Caracterización farmacológica y estudio de la relación estructura - Función del receptor nicotínico alfa 9. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3338_Verbitsky.pdf

Cita tipo Chicago:

Verbitsky, Miguel. "Caracterización farmacológica y estudio de la relación estructura - Función del receptor nicotínico alfa 9". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3338_Verbitsky.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tesis para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

***Caracterización Farmacológica y Estudio de la
Relación Estructura – Función
del Receptor Nicotínico $\alpha 9$***

Autor: Lic. Miguel Verbitsky
Directora: Dra. Ana Belén Elgoyhen

**Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética
y Biología Molecular (INGEBI, CONICET)**
2001

INGEBI
CONICET

A Moira

Agradezco

Al Estado Argentino y a todas las personas honestas que con su esfuerzo y sacrificio lo sostienen y defienden porque, a través de las Escuelas D. F. Sarmiento, Pcia. de San Juan y J. Balestra, la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la **Universidad de Buenos Aires**, el **Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas**, el Instituto de Biología y Medicina Experimental, el Instituto de Investigaciones Farmacológicas y el Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular, me permitieron acceder a una excelente educación pública y gratuita y me dieron la oportunidad de formarme y llegar a desarrollar y defender mi tesis de Doctorado.

A la Dra. Elgoyhen por haberme guiado y formado con rigurosidad académica e inteligencia, por haberme enseñado el valor del trabajo experimental y haberme dado la afortunada oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo.

A Belén Elgoyhen por haberme irradiado con su calidad humana, por haber estado presente siempre que la necesité y ausente cuando no la necesité, por su generosidad y su afecto, por ser una persona tan rara en estos tiempos y en este mundo.

A Carla Rothlin por haber sido la mejor compañera que pude haber tenido, por su bondad y honestidad, por su tolerancia a mis defectos, por nuestros contrastes que hicieron más auténtica la amistad que construimos, por su docencia farmacológica, por su tosidez y su optimismo constitutivo.

A la Dra. Eleonora Katz por su amistad, su ejemplo de trabajo, su docencia electrofisiológica y su permanente y generosa ayuda.

A Paola Plazas, Noelia Weisstaub, Ana Flor Silbering, Juan Goutman, Pablo Pomata, Gastón Sendin y Carolina Wedemeyer, por su amistad, compañerismo y ayuda, por todas las dificultades cotidianas que atravesamos juntos y los buenos momentos compartidos.

Al Dr. Daniel Calvo por su amistad, por sus recetas científicas y culinarias, por sus consejos académicos y aportes a nuestro trabajo.

Al Dr. Torres y la Dra. Flawia mi reconocimiento por haber inventado el INGEBI y a pesar de todas las restricciones que impone la realidad, haberlo mantenido siempre lleno de gente entusiasmada, haciendolo un ambiente de trabajo estimulante que ayudó a formarse y a progresar a tantos científicos. Mi agradecimiento por sus consejos y por el apoyo que me brindaron en las buenas y en las malas.

A Norberto Malarini por su amistad y sus sabias enseñanzas y por hacernos la vida más fácil con su trabajo.

Al Dr. Marcelo Rubinstein por las estimulantes y formativas conversaciones, las críticas que infaliblemente fueron útiles y constructivas, por los consejos académicos y por su apoyo en mis proyectos futuros.

A Tomás Falzone, Verónica Otero, Diego Gelman, Claudia Kleinman, Elena Avale, Claudio Pereira, Guillermo Alonso, Daniel Portal, Maxi D'Angelo, Cristina Paveto, Fernando Bravo, Ken Kobayashi, Hernán Lorenzi, Claudia Ben Dov, Isabel Santori, José Chico; a los Dres. Paladini, Levin, Iribarren, Mentaberry e Iñón y a Marta, Irma, Mary, Leonor y Francisco y a todos los demás becarios, postdocs, investigadores, técnicos, administrativos y artesanos del INGEBI por su buena onda y su ayuda.

Al Dr. Rubio por el respaldo que me brindó al comienzo de esta etapa de mi carrera y su generosa ayuda en proporcionar reactivos necesarios para el desarrollo de nuestro trabajo.

A Gustavo Dziejczapolski, Liliana Menalled, Victoria Mendizabal y mis demás compañeros del ININFA por su camaradería, ayuda y amistad.

A la Dra. Tesone, la Dra. Dain, el Dr. Barañaio, el Dr. Bussmann, el Dr. Tezon, los entonces Lic. Lanuza y Colman Lerner, la Sra. Lugo, el Sr. Nieves y a todos mis compañeros del IBYME por haber ayudado a mi formación durante mi primer paso por Obligado.

Al Dr. Olabe Iparraguirre por haberme iniciado en la investigación y en la docencia.

A Fabián Biali por su amistad y consejos y por haberme presentado a la Neurociencia.

A mi mujer Moira Sauane y a mis padres Laura Sofovich y Horacio Verbitsky por haberme dado su ejemplo, apoyo, ayuda, amor y compañía a lo largo, largo, largo de mi trabajo de doctorado.

En memoria de José Luis D'Alessio, Luis Guagnini, Berta Yusem de Sofovich, Bernardo Verbitsky, el Dr. Omar Argentino Guagnini, Guillermo Nuñez y Norberto Contreras.

RESUMEN

En este trabajo se presenta una extensa caracterización del receptor colinérgico nicotínico $\alpha 9$, utilizando el sistema de expresión heteróloga de ovocitos de *Xenopus laevis*. Durante la mayor parte del desarrollo del mismo se tuvo como hipótesis de trabajo que $\alpha 9$ sería la única subunidad integrante del receptor colinérgico nativo de las células ciliadas externas de la cóclea y de las células tipo II del aparato vestibular. Este receptor es responsable de la inhibición de la actividad de dichas células, mediada por la inervación colinérgica eferente coclear y vestibular. En 2001 se identificó y clonó una nueva subunidad de receptores nicotínicos, $\alpha 10$. Esto condujo a modificar la hipótesis de trabajo, para incluir la posibilidad de un receptor heteromérico $\alpha 9\alpha 10$ en las células ciliadas, pero sin excluir la posible existencia del receptor homomérico $\alpha 9$ en otros tipos celulares.

La caracterización del receptor homomérico recombinante $\alpha 9$ incluyó el estudio de las propiedades farmacológicas del mismo. En particular, se demostró que a pesar que $\alpha 9$ es un miembro de la familia de genes de subunidades de receptores nicotínicos, el receptor no puede ser clasificado farmacológicamente como nicotínico o muscarínico y presenta un perfil farmacológico mixto, en coincidencia con lo reportado para el receptor nativo de las células ciliadas. Se mostró que tanto agonistas colinérgicos no específicos como la acetilcolina y el carbacol, agonistas nicotínicos como el metilcarbacol, la suberildicolina y el DMPP y agonistas muscarínicos como la oxotremorina - M, el metilfurfuretonio y el McN-A-343 son capaces de activar al receptor $\alpha 9$. También la colina, un producto de degradación y precursor en la síntesis de la acetilcolina, activó al receptor $\alpha 9$. Notablemente, agonistas nicotínicos clásicos como la epibatidina, la nicotina y la citisina bloquearon al receptor $\alpha 9$ (IC_{50} 1.6 \pm 0.1, 31.5 \pm 1.0 y 43.1 \pm 3.5 μ M, respectivamente). Se estudió la sensibilidad de $\alpha 9$ a diversos antagonistas nicotínicos. En particular la metillicaconitina, un antagonista selectivo de receptores nicotínicos neuronales sensibles a la α -bungarotoxina, inhibió las respuestas de $\alpha 9$ a la acetilcolina en forma competitiva (IC_{50} : 1.1 \pm 0.2 nM), siendo este el antagonista más potente de $\alpha 9$ hasta ahora reportado. Se demostró también que el receptor $\alpha 9$ es bloqueado tanto por agonistas como por antagonistas muscarínicos con el siguiente orden de potencia: atropina (IC_{50} : 1.0 \pm 0.1 μ M,) \approx galamina (IC_{50} : 1.5 \pm 0.2 μ M) > pilocarpina (IC_{50} : 76 \pm 9 μ M) \approx muscarina (IC_{50} : 84 \pm 6 μ M) \approx betanecol (IC_{50} : 105 \pm 14 μ M), un rango de concentraciones comparable con las requeridas para el bloqueo producido por compuestos nicotínicos.

Por otra parte, se demostró la inhibición de la respuesta a acetilcolina de los receptores $\alpha 9$ y $\alpha 9\alpha 10$ por morfina y péptidos opioides. Estos péptidos estarían presentes en la inervación eferente a las células ciliadas del aparato vestibular y modularían su actividad a través de su acción sobre $\alpha 9\alpha 10$.

Se demostró también que el receptor homomérico $\alpha 9$ es bloqueado por Ca^{++} extracelular (IC_{50} : 100 \pm 10 μ M a -70 mV), en forma dependiente del potencial de membrana. Este resultado es relevante para la fisiología de las células ciliadas.

Mediante la construcción de una subunidad quimérica entre $\alpha 9$ y el receptor de serotonina de tipo 3A, se aportó evidencia de que el dominio aminoterminal de $\alpha 9$ es el determinante estructural de la interacción de $\alpha 9$ con agonistas y antagonistas. También se construyó una subunidad quimérica mediante el empalme de porciones de las subunidades $\alpha 7$ y $\alpha 9$. Los resultados obtenidos con las dos quimeras mencionadas, indican que los determinantes estructurales de la particular relación corriente - potencial de $\alpha 9$ (relacionada con la presencia de Ca^{++} extracelular), estarían confinados a la región que se extiende desde el comienzo del segundo segmento hidrófobo, supuestamente transmembranal, hasta el extremo carboxiterminal. Se identificó un residuo en el segmento hidrófobo M2 (Q261) involucrado en la rectificación de la corriente y en el bloqueo por el Ca^{++} .

En suma, el presente trabajo demuestra que el receptor $\alpha 9$ presenta una farmacología mixta nicotínica - muscarínica coincidente con la del receptor colinérgico de las células ciliadas. Esta coincidencia incluye también la sensibilidad de los receptores que contienen la subunidad $\alpha 9$ a péptidos opioides y a cationes divalentes.

Por otro lado aporta evidencia de la importancia clave del dominio aminoterminal en determinar características farmacológicas de $\alpha 9$ y del segundo segmento hidrófobo en las propiedades del canal de los receptores $\alpha 9$ y $\alpha 9\alpha 10$.

ABSTRACT

This work provides an extensive characterisation of the $\alpha 9$ nicotinic acetylcholine receptor, making use of the *Xenopus laevis* oocytes heterologous expression system. As a working hypothesis during most of the process of this work, the $\alpha 9$ protein was thought to be the only subunit present at the native acetylcholine receptors of cochlear outer hair cells and type II vestibular hair cells. These receptors mediate inhibition of the activity of these cells by cholinergic cochlear and vestibular efferent innervation. In 2001 $\alpha 10$, a new nicotinic subunit, was identified and cloned. This led to the modification of the previous hypothesis, in order to include the possibility of an heteromeric $\alpha 9\alpha 10$ receptor present in hair cells, not excluding the occurrence of homomeric $\alpha 9$ receptors in other cell types.

The characterisation of the homomeric recombinant $\alpha 9$ receptor included the study of its pharmacological properties. It is demonstrated that although $\alpha 9$ is a member of the nicotinic receptor subunit gene family, the receptor cannot be pharmacologically classified either as nicotinic or muscarinic, since it displays a mixed pharmacological profile, in coincidence with what has been reported for the hair cells native receptor. It is shown that the $\alpha 9$ receptor is activated by the non-specific cholinergic agonists acetylcholine, and carbachol, as well as by the nicotinic agonists methylcarbachol, suberyldicholine and DMPP and the muscarinic agonists oxotremorine-M, methylfurthretonium and McN-A-343. Moreover choline, both a degradation product and a precursor of the synthesis of acetylcholine activates $\alpha 9$. Remarkably nicotinic agonists such as epibatidine, nicotine and cytisine blocked the $\alpha 9$ receptor (IC_{50} : 1.6 ± 0.1 , 31.5 ± 1.0 y 43.1 ± 3.5 μM , respectively). The sensitivity of $\alpha 9$ to various nicotinic antagonists is reported. Methyllycaconitine, a specific antagonist for α -bungarotoxin-sensitive neuronal nicotinic receptors, inhibited $\alpha 9$ acetylcholine-evoked responses in a competitive manner (IC_{50} : 1.1 ± 0.2 nM), thus being the most potent $\alpha 9$ antagonist identified so far. It is also demonstrated that the $\alpha 9$ receptor is blocked by both muscarinic agonists and antagonists with the following rank order of potencies: atropine (IC_{50} : 1.0 ± 0.1 μM) \approx gallamine (IC_{50} : 1.5 ± 0.2 μM) $>$ pilocarpine (IC_{50} : 76 ± 9 μM) \approx muscarine (IC_{50} : 84 ± 6 μM) \approx betanechol (IC_{50} : 105 ± 14 μM), a concentration range which is similar to that required for the block by nicotinic compounds.

It is also demonstrated that morphine and opioid peptides inhibit acetylcholine-evoked responses in $\alpha 9$ and $\alpha 9\alpha 10$ receptors. These peptides are present at the efferent innervation to vestibular hair cells and would modulate their activity through their action on $\alpha 9\alpha 10$.

It is also demonstrated that the $\alpha 9$ homomeric receptor is blocked by extracellular Ca^{++} (IC_{50} : 100 ± 10 μM at -70 mV) in a voltage-dependent manner, a result relevant to hair cell physiology.

By means of the construction of a chimeric subunit between $\alpha 9$ and the type 3 serotonin receptor, evidence is provided that the $\alpha 9$ aminoterminal domain is the structural determinant of the $\alpha 9$ interaction with agonists and antagonists. A chimeric subunit was also constructed by splicing portions of the $\alpha 7$ and $\alpha 9$ subunits. Results obtained with the aforementioned chimeras, indicate that the structural determinants underlying the peculiar $\alpha 9$ current-voltage relationship, are confined within the region that extends from the beginning of the putative transmembrane second hydrophobic segment, to the carboxiterminus. A residue (Q261) within the the hydrophobic region M2 was identified as being involved in the rectification properties and in the block by Ca^{++} .

In summary, the present work demonstrates that the $\alpha 9$ receptor displays a mixed nicotinic-muscarinic pharmacology that matches that of the cholinergic receptor of cochlear and vestibular hair cells. The similarities between the native and the recombinant receptors extends to the sensitivity of the $\alpha 9$ -containing receptors to opioid peptides and divalent cations.

Evidence indicating the key importance of the aminoterminal domain in determining the $\alpha 9$ receptor pharmacological characteristics and of the second hydrophobic segment in the channel properties of the $\alpha 9$ and $\alpha 9\alpha 10$ receptors are also presented.

Parte de los resultados de esta tesis fueron publicados en:

Verbitsky, M., Rothlin, C. Katz, E. Elgoyhen, A. B. (2000). Mixed nicotinic-muscarinic properties of the alpha9 nicotinic cholinergic receptor. *Neuropharmacology* 39(13):2515-24

Lioudyno, M. I., Verbitsky, M., Holt, J. C., Elgoyhen, A. B., Guth, P. S. (2000). Morphine inhibits an alpha9-acetylcholine nicotinic receptor-mediated response by a mechanism which does not involve opioid receptors. *Hearing Research* 149(1-2):167-77.

Katz, E., Verbitsky, M., Rothlin, C. V., Vetter, D. E., Heinemann, S. F., Elgoyhen, A. B. (2000). High calcium permeability and calcium block of the alpha9 nicotinic acetylcholine receptor. *Hearing Research* 141(1-2):117-28

ABREVIATURAS

5HT_{3A} receptor de serotonina de tipo 3A

Å amstrong

ADN ácido deoxirribonucleico

ADNc ácido deoxirribonucleico copia

ARN ácido ribonucleico

ARNasa ribonucleasa

ACh acetilcolina

BAPTA ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacetico

BAPTA-AM acetometilester del ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacetico

CCE célula/s ciliada/s externas/s

CCI célula/s ciliada/s interna/s

CCC célula/s ciliada/s corta/s

CCV célula/s ciliada/s vestibular/es

Ch colina

DMPP 1,1-dimetil-4-fenilpiperazinio

EC₅₀ concentración efectiva para el 50% de respuesta

et al. *et alter* (y otros)

GABA ácido γ -amino butirico

i corriente

I corriente

IC₅₀ concentración efectiva para el 50% de inhibición

K lisina

min minutos

M metionina

mM milimol/litro

mV milivoltios

MLA metillicaconitina

μ A microamperio

μ M micromol/litro

μ m micrometro

n número de experimentos independientes

N asparagina

nA nanoamperios

nm nanometros

NMDA N-metil-D-aspartato

Oligo oligonucleotido

pA picoamperio

p valor de probabilidad de diferencia por azar

PCR *polimerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)

Q glutamina

R arginina

RT *reverse transcription* (transcripción reversa)

s segundos

seg segundos

t tiempo

T treonina

TEVC *two electrode voltage clamp* (fijación de voltaje con dos electrodos)

T_m temperatura de fusión

V voltaje

Otras abreviaturas como “nic” por nicotina se indican en los pies de las figuras donde aparecen.

INDICE

	página
1.1] INTRODUCCIÓN	1
1.2] Receptores nicotínicos y muscarínicos: dos clases farmacológicas, dos familias de genes, distintas funciones	3
1.3] Distinción farmacológica entre distintos subtipos de receptores nicotínicos	10
1.4.1] Relación estructura - función de los receptores nicotínicos	14
1.4.2] <i>Estructura primaria</i>	14
1.4.3] <i>Topología de plegamiento postulada</i>	15
1.4.4] <i>Estequiometría y rasgos generales de la estructura cuaternaria</i>	16
1.4.5] <i>El segmento transmembranal M2, principal componente estructural del poro del canal</i>	17
1.4.6] <i>El sitio de unión de ACh</i>	18
1.5] El órgano de Corti y la transducción de señales auditivas	21
1.6] El aparato vestibular del oído interno: el órgano del equilibrio	28
1.7] Las subunidades nicotínicas $\alpha 9$ y $\alpha 10$ y su participación en el receptor colinérgico de las células ciliadas de la cóclea y el aparato vestibular	30
2] OBJETIVOS	39

3] MATERIALES Y MÉTODOS	40
3.1] Expresión de receptores recombinantes en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> y registros electrofisiológicos	40
3.1.1] <i>Producción de ARNc</i>	40
3.1.2] <i>Obtención y manutención de ovocitos. Procedimientos generales para la expresión heteróloga de los receptores recombinantes y registro electrofisiológico</i>	41
3.1.3] <i>Curvas concentración - respuesta</i>	42
3.1.4] <i>Curvas de inhibición y desplazamiento</i>	42
3.1.5] <i>Curvas corriente – potencial</i>	43
3.2] Mutagénesis dirigida y construcción de ADNc quiméricos	44
3.2.1] <i>Mutagénesis dirigida</i>	44
3.2.2] <i>Construcción de ADNc quiméricos</i>	45
3.3] Drogas utilizadas	47
4] RESULTADOS	50
4.1] Caracterización farmacológica del receptor $\alpha 9$: Un receptor colinérgico ionotrópico con farmacología mixta muscarínica - nicotínica.	50
4.1.1] <i>Agonistas colinérgicos inespecíficos, nicotínicos y muscarínicos activan al receptor recombinante $\alpha 9$ expresado en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i></i>	50
4.1.2] <i>Agonistas nicotínicos clásicos bloquean la respuesta del receptor $\alpha 9$ a la ACh</i>	53
4.1.3] <i>Antagonistas nicotínicos inhiben la respuesta del receptor $\alpha 9$ a ACh, siendo la metillicaconitina el más potente</i>	56
4.1.4] <i>Compuestos muscarínicos clásicos bloquean la respuesta del receptor $\alpha 9$ a ACh</i>	58
4.2] Modulación opioide de los receptores $\alpha 9$ y $\alpha 9\alpha 10$	62
4.3] Papel de los iones Ca^{++} y Mg^{++} en la modulación del receptor $\alpha 9$ y su relación con el potencial de membrana	67

4.4] **Relación estructura – función del receptor homomérico $\alpha 9$ y el receptor $\alpha 9\alpha 10$** 74

4.4.1] *El receptor $\alpha 9$ compartiría características estructurales con otros receptores de la familia de canales activados por ligando con asa de cisteína y su porción aminoterminal funciona como un dominio autónomo responsable de la interacción con la ACh* 74

4.4.2] *El segundo segmento transmembranal es un importante determinante estructural de la particular relación corriente – potencial del receptor homomérico $\alpha 9$* 80

4.4.3] *La mutación del residuo glutamina-261 por metionina en las subunidad $\alpha 9$, modifica el efecto del Ca^{++} sobre el receptor heteromérico $\alpha 9:\alpha 10$* 87

5] **DISCUSIÓN** 94

5.1] **La subunidad $\alpha 9$ de receptores nicotínicos posee características farmacológicas mixtas nicotínicas – muscarínicas coincidentes con las observadas en el receptor colinérgico nativo de las células ciliadas del oído interno** 94

5.2] **Los opioides inhiben en forma directa las respuestas colinérgicas de los receptores $\alpha 9$ y $\alpha 9\alpha 10$: Un posible mecanismo fisiológico de modulación** 104

5.3] **Las respuestas del receptor $\alpha 9$ son bloqueadas por Ca^{++} y Mg^{++} extracelular en concentraciones fisiológicas y en forma dependiente del potencial de membrana** 107

5.4] **El estudio de la relación estructura - función de las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ revela la importancia del segmento M2 en determinar las propiedades biofísicas de los receptores $\alpha 9$ y $\alpha 9:\alpha 10$. En particular el residuo $\alpha 9Q261$ está implicado en la rectificación y en la interacción de los receptores con los iones divalentes. Estos estudios muestran, además, que las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ no contribuyen en forma simétrica a la función del canal** 111

6]	CONCLUSIONES	119
7]	REFERENCIAS	120
	APÉNDICE	A1

1]

INTRODUCCIÓN

1.1]

Los neurotransmisores, una gran cantidad de drogas y algunas hormonas producen la mayoría de sus efectos biológicos a través de su interacción con receptores presentes en la superficie celular. Este concepto fue introducido por J. N. Langley en 1905, en coincidencia con las ideas de P. Ehrlich sobre los mecanismos de la respuesta inmune, al observar la extraordinaria potencia y especificidad con que algunas sustancias (los agonistas) mimetizaban la respuesta biológica, mientras que otras (los antagonistas) la prevenían¹, suponiendo que debía existir una "sustancia receptiva" en la superficie celular, responsable de estos efectos. El primer formalismo ideado para describir matemáticamente estas observaciones tuvo como autor a A. V. Hill, quien en 1909 desarrolló la ecuación que lleva su nombre². H. Dale, quien en 1914 aisló la acetilcolina (ACh) y estableció que sus efectos podían dividirse en "tipo nicotina" y "tipo muscarina"³, demostró en los años 1930 que esta molécula es liberada de los terminales nerviosos cuando los impulsos de las fibras motoras excitan la contracción muscular, y estableció el rol de la acetilcolina como transmisor químico del impulso nervioso. Luego del enorme desarrollo en el estudio y la comprensión de los eventos eléctricos en las sinapsis a partir de los trabajos de J. C. Eccles, B. Katz y S. W. Kuffler⁴ y de A. L. Hodgkin y A. F. Huxley⁵ en los años 1940 y 1950,

¹ (Langley, 1909; Langley, 1878; Langley, 1905)

² (Hill, 1913)

³ (Dale, 1914)

⁴ (Eccles et al., 1941)

⁵ (Hodgkin and Huxley, 1952)

Fatt y Katz⁶ sugirieron y A. y N. Takeuchi⁷ demostraron que el receptor nicotínico de la placa neuromuscular es un canal catiónico que se abre a partir de su interacción con la ACh. A este descubrimiento le siguieron numerosos avances en el campo de los canales activados por ligando. En el terreno experimental con la aparición de nuevas técnicas como la de radioligandos⁸ y la de medición de la corriente a través de un solo canal en parches de membrana⁹. Y, a nivel teórico, con la diferenciación conceptual entre la unión del agonista, la apertura y cierre del canal y la desensibilización, seguida por la consecuente elaboración mecanística¹⁰ y la adaptación al estudio de los canales - receptores del modelo de proteínas alostéricas desarrollado por J. Monod, J. Wyman y J. P. Changeux¹¹.

El bloqueo por el antagonista nicotínico dihidro- β -eritroidina (DH β E) de la transmisión sináptica entre axones de motoneuronas y las células de Renshaw, interneuronas del asta ventral de la médula espinal, demostró por primera vez la participación de un receptor nicotínico en la neurotransmisión en el sistema nervioso central (SNC)¹².

En los años 1980 el clonado de genes de subunidades de la familia de receptores colinérgicos nicotínicos significó un salto cualitativo fundamental en el estudio de dichos receptores y de la neurotransmisión colinérgica. Las primeras subunidades en ser clonadas fueron las del receptor de la electroplaca de la raya *Torpedo*¹³ en los laboratorios de Numa primero y subsecuentemente de J. P. Changeux y S. Heinemann, a lo que rápidamente

⁶ (Fatt and Katz, 1951)

⁷ (Takeuchi and Takeuchi, 1960)

⁸ (Paton and Rang, 1965)

⁹ (Neher and Sakmann, 1976)

¹⁰ (del Castillo and Katz, 1957; Stephenson, 1956)

¹¹ (Changeux, 1990; Changeux et al., 1984; Monod et al., 1965)

¹² (Curtis and Ryall, 1966; Eccles et al., 1954)

¹³ (Ballivet et al., 1982; Claudio et al., 1983; Giraudat et al., 1982; Noda et al., 1982; Noda et al., 1983)

le siguieron las subunidades del receptor muscular de roedores¹⁴, y luego el grupo de S. Heinemann obtuvo los primeros clones identificados de subunidades nicotínicas neuronales. En el mismo laboratorio, en 1994, A. B. Elgoyhen clonó la subunidad nicotínica $\alpha 9$, lo que permitió comenzar a zanjar la controversia sobre la naturaleza molecular del receptor colinérgico de las células ciliadas del oído interno¹⁵. Este receptor es uno de los pocos ejemplos, junto con los receptores de la placa neuromuscular, de las células de Renshaw de la médula espinal y del ganglio autonómico, en los que ha sido claramente demostrado el papel de un receptor colinérgico en la transmisión sináptica rápida¹⁶. El trabajo que aquí se presenta trata del estudio en un sistema heterólogo de expresión de las propiedades farmacológicas y biofísicas y de la relación estructura - función de los receptores colinérgicos en cuya formación participa la subunidad $\alpha 9$.

1.2]

Receptores nicotínicos y muscarínicos: dos clases farmacológicas, dos familias de genes, distintas funciones

Los receptores de ACh han sido clasificados en nicotínicos y muscarínicos. Los agonistas que dan nombre a estas dos clases son la nicotina y la muscarina. Los antagonistas prototípicos son el curare, para los receptores nicotínicos, y la atropina para los muscarínicos¹⁷. Estas dos categorías se corresponden con dos familias de genes claramente diferenciadas.

¹⁴ (Boulter et al., 1986; Boulter et al., 1985; Witzemann et al., 1990)

¹⁵ (Elgoyhen et al., 1994)

¹⁶ (Oliver et al., 2000)

¹⁷ (Dale, 1914)

Los muscarínicos son receptores acoplados a proteínas G-heterotriméricas. Son también llamados receptores colinérgicos metabotrópicos. Miembros de esta familia son la rodopsina, los receptores adrenérgicos, serotoninérgicos, de opioides, de hormona luteinizante, gustatorios, de odorantes y ciertos receptores virales, entre muchos otros. Están formados por un sólo péptido con siete pasos transmembrana¹⁸ (Figura 1A). Recientemente se ha postulado la existencia de homodímeros de receptores muscarínicos¹⁹. El sitio de unión para la acetilcolina y los antagonistas competitivos está formado por residuos ácidos, aromáticos y dadores de puente de hidrógeno en un bolsillo formado por la disposición en anillo de los siete segmentos transmembrana²⁰. Los receptores muscarínicos se encuentran principalmente en células efectoras de la división autonómica del sistema nervioso periférico (SNP), también en ganglios y en el cerebro. Los receptores muscarínicos se subclasificaron inicialmente en M₁ (ganglionares) y M₂ (de célula efectora), en base al efecto diferencial de los agonistas betanecol y McN-A-343²¹, sin embargo esta clasificación inicial resultó imprecisa y tuvo que extenderse hasta incluir cuatro subclases de receptores muscarínicos, M₁-M₄²². Estas cuatro subclases farmacológicas se corresponden con cuatro de los cinco genes identificados en el grupo de receptores muscarínicos²³

Los receptores nicotínicos, también llamados receptores colinérgicos ionotrópicos, pertenecen a la gran familia de canales iónicos dependientes de ligandos y, dentro de ésta, a la familia de receptores con asa de cisteína (*cys-loop receptors*), que incluye también a los receptores ionotrópicos de

¹⁸ (Hosey, 1992)

¹⁹ (Zeng and Wess, 1999)

²⁰ (Wess, 1993)

²¹ (Goyal, 1988; Heller Brown and Taylor, 1996)

²² (Caulfield and Birdsall, 1998; Dorje et al., 1991; Heller Brown and Taylor, 1996)

²³ (Bonner et al., 1987; Caulfield, 1993)

GABA, serotonina y glicina²⁴. A menudo se los nombra como "complejo receptor - canal", debido a que reúnen en una única molécula sitios extracelulares de unión para ligandos y un canal que permite el paso de iones (cationes en el caso del receptor colinérgico) a través de la membrana plasmática. Este tipo de canales operados por ligando media la rápida transmisión sináptica del impulso eléctrico en el sistema nervioso. El reconocimiento de la señal, que constituye la unión del neurotransmisor, es convertida por el receptor en la apertura del canal y el consecuente flujo de iones.

El primer receptor nicotínico en ser purificado y posteriormente clonado, el receptor de ACh de la electroplaca de la raya eléctrica *Torpedo californica*, es un pentámero²⁵ formado por cuatro subunidades: α , β , γ y δ con masas moleculares relativas aparentes de alrededor de 50000 y una identidad de secuencia entre subunidades de 18%²⁶. Cerca de un 10% de la masa del receptor corresponde a oligosacáridos provenientes de modificaciones postraduccionales²⁷. El perfil de hidrofobicidad de las cuatro subunidades muestra cuatro regiones hidrófobas²⁸. En base a este perfil se postuló que cada una de las subunidades atravesaría la membrana cuatro veces (Figuras 1B y 2). Ha sido demostrado que la estequiometría del pentámero es $\alpha_2\beta\gamma\delta$ ²⁹. Este receptor se usó extensamente como modelo para receptores homólogos de otras especies, como el receptor nicotínico de ACh de la placa neuromuscular de los vertebrados, debido a la altísima conservación de su

²⁴ (Grenningloh et al., 1987; Maricq et al., 1991; Noda et al., 1983; Schofield et al., 1987)

²⁵ (Hucho et al., 1978; Hucho and Changeux, 1973)

²⁶ (Claudio et al., 1983; Noda et al., 1982; Noda et al., 1983)

²⁷ (Hucho et al., 1996) y referencias allí citadas.

²⁸ (Noda et al., 1983)

²⁹ (Rafferty et al., 1980)

secuencia a través de la evolución³⁰. En vertebrados, además del receptor muscular $\alpha_2\beta\gamma\delta$ (variante embrionaria) y la forma adulta, donde la subunidad γ es reemplazada por la ϵ ³¹, existe una gran variedad de receptores nicotínicos neuronales que se encuentran en los sistemas nervioso central y periférico (Tabla 1). Los receptores neuronales conocidos están formados por dos tipos de subunidades: las α (agrupados por su homología con la subunidad α muscular y entre sí) y las β (con relativamente poca similitud entre sí, pero distintivamente "no α "). Hasta el momento se identificaron y clonaron siete subunidades nicotínicas neuronales α y tres β de vertebrados, α_2 - α_8 y β_2 - β_4 ³². La subunidad α_8 , expresada en el sistema nervioso central del pollo, no ha podido ser encontrada en mamíferos³³.

La especie más abundante de receptor colinérgico nicotínico presente en el SNC de los vertebrados está formada por las subunidades α_4 y β_2 y representa la mayoría de los sitios de alta afinidad para nicotina en el SNC de rata y pollo³⁴. La α -bungarotoxina se une con alta afinidad a otro receptor importante en el SNC y el SNP, que contiene a la subunidad α_7 ³⁵. Un tercer subtipo se expresa principalmente en neuronas autonómicas y se compone de subunidades α_3 , y β_4 , probablemente α_5 y en algunos casos β_2 ³⁶.

Los canales de los receptores colinérgicos nicotínicos son específicamente permeables a cationes pero no distinguen con gran selectividad entre distintos cationes monovalentes, sin embargo difieren entre ellos por su

³⁰ (Sargent, 1993)

³¹ (Mishina et al., 1986)

³² (Sargent, 1993; Role, 1992)

³³ (Schoepfer et al., 1990; Schoepfer et al., 1988)

³⁴ (Schoepfer et al., 1988; Whiting and Lindstrom, 1987; Whiting et al., 1991; Whiting et al., 1987)

³⁵ (Couturier et al., 1990; Schoepfer et al., 1990; Séguéla et al., 1993; Vernallis et al., 1993; Zhang et al., 1994)

³⁶ (Conroy et al., 1992; Listerud et al., 1991; Ramirez-Latorre et al., 1996; Vernallis et al., 1993)

permeabilidad y sensibilidad al Ca^{++} ³⁷. Así, por ejemplo, la fracción de corriente llevada por Ca^{++} a través del canal del receptor colinérgico de la placa neuromuscular es pequeña (Cociente de permeabilidades a Ca^{++} y Na^+ : $P_{\text{Ca}^{++}}/P_{\text{Na}^+} = 0.2 - 0.3$) pero biológicamente significativa y este ion reduce la permeabilidad del canal a iones monovalentes³⁸. Los receptores neuronales son más permeables, especialmente el receptor $\alpha 7$ es el más permeable ($P_{\text{Ca}^{++}}/P_{\text{Na}^+} = 10 - 20$)³⁹ y no es bloqueado por iones divalentes⁴⁰. Además el Ca^{++} es un potenciador alostérico de la respuesta a ACh de los receptores nicotínicos muscular y neuronales⁴¹.

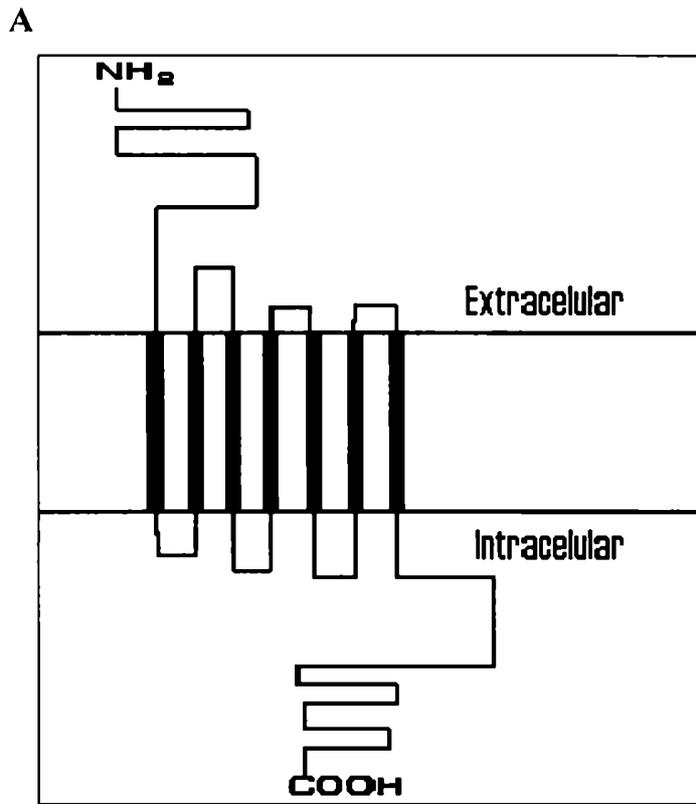
³⁷ (Fieber and Adams, 1991; Mulle et al., 1992; Nutter and Adams, 1995)

³⁸ (Adams et al., 1980; Decker and Dani, 1990; Vernino et al., 1994)

³⁹ (Sands and Barish, 1991; Séguéla et al., 1993)

⁴⁰ (Castro and Albuquerque, 1993; Mulle et al., 1992; Rogers and Dani, 1995)

⁴¹ (Amador and Dani, 1995; Eisele et al., 1993; Galzi et al., 1996; Ramirez-Latorre et al., 1996; Sine et al., 1990; Vernino et al., 1992)



B

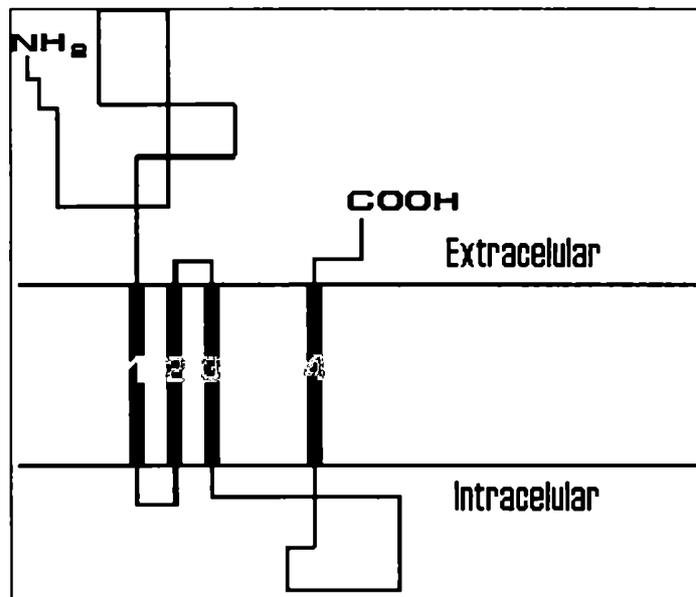


Figura 1: Receptores muscarínicos y nicotínicos

Representación esquemática de la topología de plegamiento propuesta para las subunidades de los receptores colinérgicos muscarínicos (A) y nicotínicos (B).

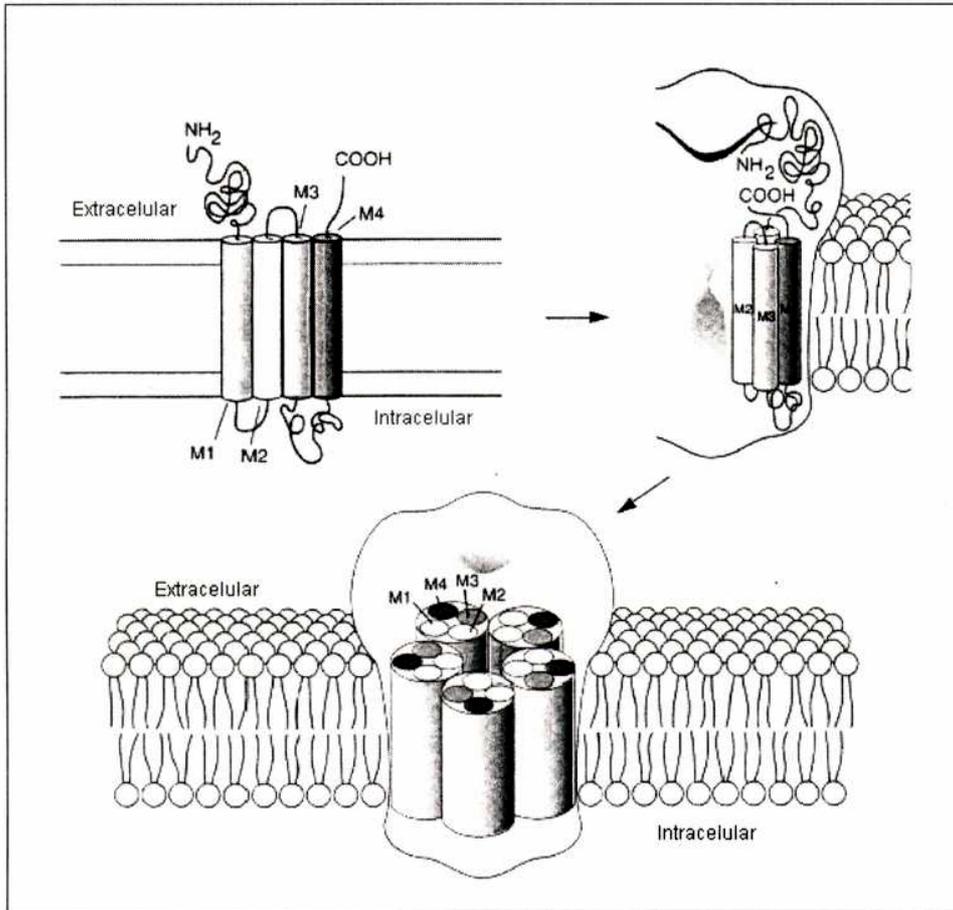


Figura 2: Estructuras terciaria y cuaternaria de los receptores nicotínicos

Representación esquemática de la estructura de los receptores nicotínicos postulada en base a la evidencia experimental disponible. Las subunidades se ordenarían en un arreglo pentamérico alrededor de un eje central correspondiente al poro del canal. Se ha propuesto que, en conjunto, los segundos segmentos transmembrana (M2) de las cinco subunidades tapizarían las paredes del canal.

musculares	neuronales	de las células ciliadas
$\alpha 1$ $\beta 1$ γ ϵ	$\alpha 2$ $\beta 2$	$\alpha 9$ $\alpha 10$
	$\alpha 3$ $\beta 3$	
	$\alpha 4$ $\beta 4$	
	$\alpha 5$	
	$\alpha 6$	
	$\alpha 7$	
	$\alpha 8$	

Tabla 1 - Subunidades de receptores nicotínicos de vertebrados

1.3]

Distinción farmacológica entre distintos subtipos de receptores nicotínicos

La farmacología provee de herramientas experimentales que han hecho posible distinguir entre distintos subtipos de receptores nicotínicos. Estas diferencias farmacológicas son relevantes en cuanto que los receptores nicotínicos pueden ser blancos de estrategias terapéuticas y en la medida que reflejan variaciones en la forma en que estos receptores responden a ligandos endógenos. Mas aún, la caracterización farmacológica de receptores nativos ha sido el eje conductor en la identificación y el clonado de nuevas subunidades. Sin embargo, en el caso de los receptores neuronales ha sido difícil correlacionar la farmacología de los receptores nativos con su

composición de subunidades y estequiometría. Una excepción en este sentido es el receptor homomérico formado por la subunidad $\alpha 7$.

En primer lugar, existen claras diferencias farmacológicas entre el receptor nicotínico de la placa neuromuscular y los diversos receptores nicotínicos neuronales. Así, la suberildicolina es un agonista más potente que la ACh sobre el receptor muscular, mientras que generalmente ocurre lo inverso en los receptores nicotínicos neuronales⁴²; la epibatidina, un agonista nicotínico extremadamente potente, presenta afinidad selectiva por los receptores neuronales; el decametonio es más efectivo en bloquear el receptor muscular que los receptores ganglionares, observándose lo opuesto para el caso del hexametonio⁴³. Las toxinas de serpiente α y κ -bungarotoxina presentan selectividades diferentes frente a los distintos receptores nicotínicos: la α -bungarotoxina bloquea en forma potente al receptor muscular mientras que la mayor parte de los receptores neuronales son insensibles a esta toxina⁴⁴. Una excepción importante son los receptores nicotínicos del cerebro de los mamíferos con afinidad por α -bungarotoxina, que contienen la subunidad $\alpha 7$ ⁴⁵. La κ -bungarotoxina (también llamada n-bungarotoxina, n por neuronal) tiene mayor potencia que la α -bungarotoxina sobre los receptores nicotínicos ganglionares y bloquea la respuesta de muchos receptores nicotínicos centrales⁴⁶, pero es poco efectiva en la placa neuromuscular.

La expresión en ovocitos de *Xenopus laevis* en combinaciones de a pares α , β de las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$ o $\alpha 4$ y $\beta 2$ o $\beta 4$, lleva a la formación de seis variedades de canales heteroméricos activables tanto por la ACh como por la

⁴² (Lukas, 1989)

⁴³ (Sargent, 1993)

⁴⁴ (Gillespie, 1995)

⁴⁵ (Clarke, 1992; Couturier et al., 1990)

⁴⁶ (Sargent, 1993)

nicotina y existen también heterómeros neuronales con más de dos subunidades distintas. Estas combinaciones son distinguibles por sus perfiles farmacológicos. Así, el receptor $\alpha 3\beta 2$ es bloqueado por concentraciones nanomolares de κ -bungarotoxina mientras que, al igual que para el caso del receptor muscular, esta toxina es sólo un bloqueante parcial y poco potente del receptor $\alpha 4\beta 2$ y prácticamente incapaz de bloquear a los receptores $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 2\beta 4$, $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 4\beta 4$ ⁴⁷. La citisina, un agonista intermedio en eficacia entre la ACh y la nicotina sobre los receptores musculares, es un agonista muy efectivo para los receptores que contienen la subunidad $\beta 4$, pero poco efectivo para aquellos con la $\beta 2$ ⁴⁸, actuando inclusive como antagonista competitivo⁴⁹. La d-tubocurarina, potente bloqueante de la placa neuromuscular, también bloquea la respuesta de los receptores que contienen la subunidad $\beta 2$, siendo el mayor efecto sobre el receptor formado con $\alpha 2$; en contraste, la d-tubocurarina potencia la respuesta de los receptores con la subunidad $\beta 4$ a bajas concentraciones de ACh. Manteniendo la subunidad β constante y variando la subunidad α se observan diferencias en la sensibilidad a la nicotina, la κ -bungarotoxina y otros ligandos⁵⁰.

La subunidad nicotínica neuronal $\alpha 7$ (también la subunidad $\alpha 8$, sólo encontrada en aves) forma un receptor homomérico al ser expresado en sistemas heterólogos, con características farmacológicas que lo distinguen no sólo del receptor muscular sino también de los receptores neuronales heteroméricos. La respuesta del receptor $\alpha 7$ es bloqueada por α -bungarotoxina y notablemente, por la estricnina, un bloqueante de receptores

⁴⁷ (Duvoisin et al., 1989; Luetje et al., 1990)

⁴⁸ (Colquhoun and Patrick, 1997; Luetje and Patrick, 1991)

⁴⁹ (Papke and Heinemann, 1994)

⁵⁰ (Luetje and Patrick, 1991; Luetje et al., 1990)

de glicina⁵¹. La toxina vegetal MLA es un bloqueante específico y extremadamente potente del receptor homomérico $\alpha 7$ ⁵².

Los perfiles farmacológicos de los diferentes receptores nicotínicos pueden ser descritos en base al orden de potencia de distintos agonistas (que no necesariamente coincide con el orden de eficacia) y antagonistas (Tabla 2).

Receptor	orden de potencia de agonistas	orden de potencia de antagonistas
$\alpha 1\beta 1\gamma\delta$	suberildicolina > ACh > epibatidina > dimetilfenilpiperazonio (DMPP) > citisina \approx nicotina	α -bungarotoxina > d-tubocurarina > mecamilamina > DH β E
$\alpha 3\beta 4$	epibatidina > DMPP > nicotina \approx citisina \approx suberildicolina > ACh	mecamilamina > d-tubocurarina > DH β E
$\alpha 4\beta 2$	epibatidina > nicotina > citisina > DMPP > ACh > carbacol	mecamilamina > DH β E > MLA > d-tubocurarina
$\alpha 7$	epibatidina > DMPP > citisina > nicotina > ACh > colina	α -bungarotoxina > MLA > d-tubocurarina > DH β E

Tabla 2 - Orden de potencia de agonistas y antagonistas para distintas especies de receptores nicotínicos (Reproducción parcial de la tabla aparecida en "TIPS 2000 Receptor & Ion Channel Nomenclature Supplement" pp 7-9)

A menudo ha sido difícil correlacionar los resultados provenientes de la expresión de distintas combinaciones de subunidades nicotínicas en sistemas

⁵¹ (Amar et al., 1993; Gerzanich et al., 1994)

⁵² (Alkondon et al., 1992; Puchacz et al., 1994)

heterólogos con los datos obtenidos con los receptores nativos. En este sentido y como se verifica en este trabajo el receptor colinérgico de las células ciliadas es una excepción.

1.4]

Relación estructura - función de los receptores nicotínicos

1.4.1]

Para comprender el mecanismo por el cual la unión de la ACh a los receptores nicotínicos se traduce en la apertura del canal y el flujo de determinadas especies catiónicas a través del mismo, cómo ocurre la interacción específica con los ligandos y con los iones y cómo son discriminados los agonistas y antagonistas, es de fundamental importancia obtener información estructural de la molécula receptora.

1.4.2]

Estructura primaria

Las subunidades de receptores nicotínicos comparten entre sí una gran similitud de secuencia. Esta similitud incluye la presencia de dos residuos de cisteína en la región amino terminal, separados por otros trece aminoácidos y unidos por puente disulfuro (el asa de cisteínas), y un perfil de hidrofobicidad que muestra cuatro regiones hidrofóbicas M1-M4, además del péptido señal, que constituirían segmentos transmembranales⁵³. Estas características también son compartidas por las subunidades de los canales activados por serotonina, glicina y GABA, lo que a llevado a agrupar a estos

⁵³ (Claudio et al., 1983; Devillers-Thiéry et al., 1993; Noda et al., 1983)

cuatro tipos de receptores en la llamada familia de receptores de asa de cisteínas (*cys-loop receptors*)⁵⁴. Las subunidades α tienen además dos residuos de cisteína adyacentes en las posiciones 191 y 192 (numeración $\alpha 1$) que las distinguen de los otros tipos de subunidades de receptores nicotínicos⁵⁵.

1.4.3]

Topología de plegamiento postulada

El modelo mayormente aceptado para el plegamiento de las subunidades de estos receptores consiste en un gran dominio amino terminal extracelular seguido por los cuatro segmentos transmembranales postulados según el patrón de hidrofobicidad, con un dominio intracelular formado por la larga porción de secuencia que conecta los segmentos M3 y M4 y un pequeño dominio carboxi terminal extracelular⁵⁶ (Figura 1B). La evidencia experimental que apoya estas predicciones incluye experimentos de N - glicosilación en sitios naturales o introducidos artificialmente, de accesibilidad de cisteínas (*SCAM*), de proteínas de fusión y la fosforilación de residuos entre M3 y M4⁵⁷. Sin embargo, estos experimentos, realizados sólo sobre algunas de las subunidades nicotínicas, no son suficientes para asegurar ni la veracidad ni la generalidad del patrón de plegamiento postulado e inclusive se han reportado algunos hallazgos no concordantes⁵⁸. De todas maneras este modelo es generalmente utilizado como hipótesis de trabajo y tiene gran aceptación en este campo de estudio.

⁵⁴ (Betz et al., 1999; Grenningloh et al., 1987; Maricq et al., 1991; Noda et al., 1983; Schofield et al., 1987)

⁵⁵ (Kao and Karlin, 1986; Karlin and Akabas, 1995)

⁵⁶ (Karlin, 1993; McCrea et al., 1987)

⁵⁷ (Chavez and Hall, 1992; Chavez and Hall, 1991; Czajkowski et al., 1989; DiPaola et al., 1989; Poulter et al., 1989; Strecker et al., 1994)

⁵⁸ (Hucho et al., 1996; Pedersen et al., 1990)

1.4.4]

Estequiometría y rasgos generales de la estructura cuaternaria

El receptor nicotínico muscular es un pentámero y también se ha demostrado la existencia de complejos canal - receptor funcionales pentaméricos de composición $\alpha_4\beta_2$ y α_7 ⁵⁹. Se cree que el ensamble pentamérico es común a todos los receptores nicotínicos y a los demás miembros de la familia de receptores de asa de cisteínas⁶⁰. Tal arreglo de subunidades con alta homología, en una molécula que forma un canal a través de la membrana, sugiere una disposición seudossimétrica alrededor de un eje ubicado en el poro del canal (Figura 2). Los resultados de experimentos de marca con sondas fotoactivables y de mutagénesis específica concuerdan con esta geometría⁶¹. Más aún, las imágenes tridimensionales y los mapas de proyección (0.9 y 0.75 nm de resolución respectivamente) derivados de la microscopía electrónica de receptores nicotínicos de *Torpedo marmorata*, muestran claramente como cinco grupos de densidad electrónica, correspondientes a las cinco subunidades, se ordenan alrededor de un poro central en forma aproximadamente simétrica⁶². Las subunidades se ven como cuerpos elongados de 12.5 nm de largo, extendiéndose 6 nm por encima de la superficie externa de la membrana plasmática y 2 nm más allá del lado interno (Figura 3). El tubo cilíndrico encerrado por las subunidades tiene un diámetro de aproximadamente 2.5 nm en la boca del canal y se angosta en el plano de la membrana fuera del alcance de la resolución del microscopio electrónico.

⁵⁹ (Anand et al., 1991; Cooper et al., 1991)

⁶⁰ (Karlin and Akabas, 1995)

⁶¹ (Heidmann et al., 1983; Revah et al., 1990)

⁶² (Unwin, 1993; Unwin, 1996);

1.4.5]

El segmento transmembranal M2, principal componente estructural del poro del canal

La microscopía electrónica también reveló tres cilindros de mayor densidad en la región extracelular y un cilindro torcido en el dominio transmembranal (Figura 3). Se postuló que el cilindro de densidad en la región de la bicapa lipídica correspondería al segmento M2⁶³, el cual tapizaría el poro del canal. Esta suposición estaba apoyada por experimentos de electrofisiología y mutagénesis dirigida⁶⁴ y de marca con sondas químicas⁶⁵. Posteriormente se demostró la exposición en el lumen del canal, de residuos comprendidos entre glicina-240 y ácido glutámico-262 (numeración $\alpha 1$) del segmento M2, mediante experimentos de accesibilidad de cisteínas introducidas por mutagénesis (*SCAM*) en la subunidad $\alpha 1$ del receptor nicotínico muscular de ratón⁶⁶. Estos experimentos también aportaron evidencia de que al menos parte del segmento M2 tendría conformación α -hélice.

El canal formado por los segmentos transmembranales M2 de las cinco subunidades tiene forma de embudo, lo cual se concluye de los tres diámetros decrecientes observados: 2.0-2.5 nm en la boca del canal (microscopía electrónica del receptor), 1.15 nm en el sitio de unión de antagonistas no competitivos (cristalografía de rayos X de la molécula bloqueante) y 0.64 nm (ion permeante más pequeño)⁶⁷. Esto implica que hacia el lado extracelular habría lugar entre los segmentos M2 para otras regiones transmembranales. Probablemente estos espacios estarían ocupados

⁶³ (Unwin, 1993)

⁶⁴ (Cohen et al., 1992; Dani, 1989; Galzi et al., 1992; Imoto et al., 1988; Leonard et al., 1988; Revah et al., 1991; Villaroel et al., 1991)

⁶⁵ (Hucho et al., 1986; Pedersen et al., 1992; Revah et al., 1990; White and Cohen, 1992)

⁶⁶ (Akabas et al., 1994; Akabas et al., 1992)

⁶⁷ (Hucho et al., 1996) y referencias allí citadas.

por porciones de los segmentos M1, ya que se demostró que residuos hacia el extremo extracelular de dicho segmento también están expuestos en la boca del canal⁶⁸. La evidencia experimental no es consistente ni con una conformación β ni con una α -hélice para todo el largo del segmento M1 que podría tener una estructura secundaria irregular⁶⁹.

1.4.6]

El sitio de unión de ACh

La microscopía electrónica de receptores nicotínicos de la electroplaca de la raya *Torpedo* muestra tres cilindros de densidad en la región extracelular de cada subunidad, aunque más pronunciados en las subunidades α , a una distancia de aproximadamente 3 nm de la bicapa lipídica. Estas estructuras forman cavidades que, se propuso, formarían los sitios de unión para la ACh⁷⁰. Sin embargo existe una gran cantidad de evidencias provenientes de experimentos de mutagénesis dirigida y marcación con sondas químicas, que dan fuerza a la hipótesis que asigna los sitios de unión de ACh a estructuras formadas por las interfaces entre una subunidad α y la γ y entre la otra subunidad α y la δ ⁷¹. En la subunidad α se identificaron varios residuos involucrados en la unión de agonistas. Estos residuos que incluyen las cisteínas contiguas 192 y 193, las tirosinas 93, 190 y 198 y el triptofano 149 (numeración α 1)⁷², se agrupan en tres segmentos o lazos discontinuos que se acercan merced a la estructura terciaria de la proteína⁷³. También aminoácidos en las subunidades γ y δ participan de los sitios de unión: los

⁶⁸ (Akabas and Karlin, 1995; DiPaola et al., 1990)

⁶⁹ (Karlin and Akabas, 1995) y referencias allí citadas.

⁷⁰ (Unwin, 1993)

⁷¹ (Blount and Merlie, 1989; Czajowski and Karlin, 1991; Kurosaki et al., 1987; Pedersen et al., 1990)

⁷² (Dennis et al., 1988; Galzi et al., 1990; Kao and Karlin, 1986; Middleton and Cohen, 1991)

⁷³ (Changeux, 1995)

aspárticos 180 y 189 y el triptofano 57 en δ , el aspártico 174 y el triptofano 55 en γ ⁷⁴. Estos aminoácidos con carga neta o densidad de carga negativas interaccionarían con el grupo amonio cuaternario de la ACh, mientras que los residuos de los mencionados tres lazos en la subunidad α lo harían con el otro extremo de la molécula. Los aminoácidos en las subunidades γ y δ involucrados en la unión de agonistas se alinean con posiciones en las subunidades $\alpha 2$ - $\alpha 10$ ocupadas por los mismos aminoácidos⁷⁵. Este modelo para el sitio de unión de ACh del receptor muscular con dos subsitios, los tres lazos en la subunidad α y el subsitio de interacción con el amonio cuaternario en la subunidad γ o la δ , ha sido revalidado con evidencias experimentales en el receptor homomérico $\alpha 7$ ⁷⁶.

La activación por ACh (y no por serotonina) de un receptor homomérico formado por subunidades quiméricas resultantes del empalme de la región aminoterminal de la subunidad nicotínica $\alpha 7$ y la región carboxiterminal del receptor $5HT_{3A}$, desde el primer segmento hidrofóbico, demostró definitivamente que el sitio de unión de ACh del receptor $\alpha 7$ se encuentra en el dominio aminoterminal extracelular⁷⁷.

⁷⁴ (Cohen et al., 1992; Czajowski and Karlin, 1991; Czakowski et al., 1993; O'Leary et al., 1994).

⁷⁵ Excepto por $\alpha 3$ -N169 alineado con γ -D174.

⁷⁶ (Corringer et al., 1995; Devillers-Thiéry et al., 1993; Galzi et al., 1991)

⁷⁷ (Eisele et al., 1993)

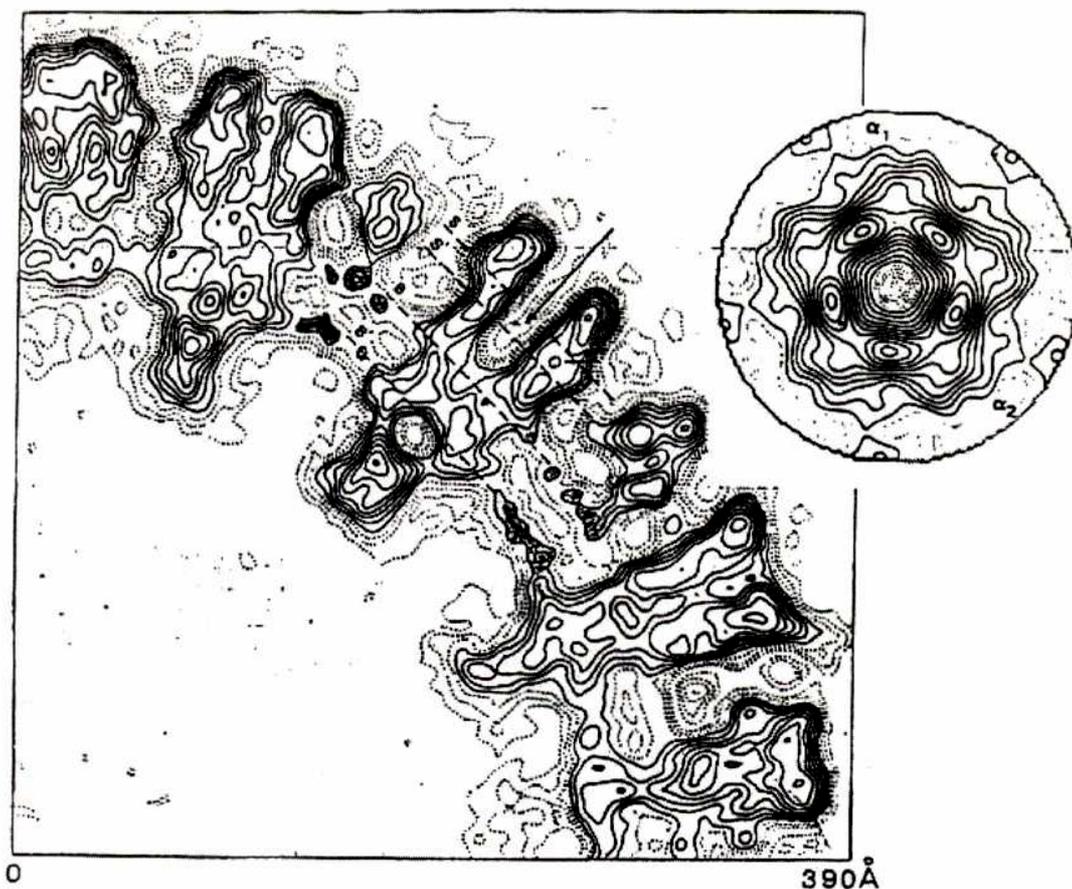


Figura 3: Imagen de microscopía electrónica de receptores nicotínicos

Esta figura (reproducida de Hucho et. al. Eur. J. Biochem: 239:539-557, 1996) muestra imágenes de microscopía electrónica de membranas ricas en receptores colinérgicos nicotínicos de la raya *Torpedo*. La flecha indica el camino presumiblemente seguido por los iones desde el lado extracelular. La forma casi rectangular en el lado citoplasmático representa la rapsina. El inserto circular muestra una sección de la molécula del AChR vista desde el lado extracelular.

1.5]

El órgano de Corti y la transducción de señales auditivas

El órgano de Corti es el epitelio neurosensorial de la cóclea de los mamíferos (Figuras 4 y 5). Contiene las células ciliadas, responsables de la transducción de estímulos sonoros en señales eléctricas. Dichas células, junto con otros tipos celulares, descansan sobre la membrana basilar (MB) de la cóclea, son células polarizadas y están bañadas por dos fluidos: la endolinfa en su parte apical y la perilinfa en sus superficies basolaterales⁷⁸. Cuando los estímulos sonoros (ondas de presión) atraviesan el oído externo, presionan la membrana timpánica. Esta presión se transmite mecánicamente a través de una cadena de pequeños huesos en el oído medio. El último de estos huesos, el estribo, se encuentra en contacto con los fluidos de la cóclea a través de la membrana que recubre la ventana oval. Los movimientos del estribo se traducen en cambios de presión en los fluidos cocleares, lo que a su vez produce el movimiento ondulatorio de la MB, enrollada dentro de la cóclea⁷⁹. Debido a la morfología y las propiedades mecánicas de esta membrana, la región donde dicha vibración alcanza su máxima amplitud depende de la frecuencia del estímulo sonoro. Los estímulos de mayor frecuencia producen mayor movimiento en la región cercana a la ventana oval mientras que aquellos de baja frecuencia lo hacen hacia el otro extremo de la MB⁸⁰.

⁷⁸ (Slepecky, 1996)

⁷⁹ (Gannong, 1999)

⁸⁰ (Patuzzi, 1996)

En los mamíferos, las células ciliadas se dividen anatómicamente en una fila de células ciliadas internas (CCI) y tres filas de células ciliadas externas (CCE)⁸¹.

Las CCI son los fonoreceptores, que actúan como transductores del estímulo auditivo. La vibración de la MB genera consecuentemente el movimiento de las cilias de las CCI, inmersas en la endolinfa. Este movimiento produce la apertura de canales catiónicos mecanoreceptores en las cilias. Se produce así la despolarización de la membrana plasmática, lo que lleva a entrada de Ca^{++} a través de canales dependientes de voltaje y la consiguiente liberación de neurotransmisor desde la región basal de las CCI, bañada por la perilinfa, hacia su sinapsis con fibras del nervio auditivo⁸². Los cuerpos de las neuronas aferentes que inervan las CCI se encuentran en el ganglio espiral, dentro del modíolo, en el centro del espiral que forma la cóclea. Los axones de estas neuronas forman la división coclear del nervio vestibulococlear y terminan en los núcleos dorsal y ventral cocleares de la *medula oblongata*⁸³. Así se produce la conversión del estímulo auditivo en un impulso eléctrico que se transmite y procesa en el SNC.

Por otro lado, las CCE están implicadas en la amplificación mecánica del sonido y en la sintonización fina del movimiento de la MB⁸⁴. La vibración de la MB produce también el movimiento de las cilias de las CCE, inmersas en la endolinfa y en contacto con la membrana tectorial. Esto produce la apertura de los canales mecanoreceptores, induce cambios en el potencial de

⁸¹ (Slepecky, 1996)

⁸² (Gillespie, 1995)

⁸³ (Gannong, 1999)

⁸⁴ (Ashmore, 1987)

membrana y en la movilidad de las CCE. Este cambio de movilidad, recíprocamente, modifica las propiedades mecánicas de la MB⁸⁵.

Si bien las CCE pueden modificar la mecánica de la cóclea sin intervención del SNC, estas células reciben una innervación eferente colinérgica⁸⁶ del sistema olivococlear medial⁸⁷. La actividad de esta vía eferente provoca la liberación de ACh de los eferentes olivococleares en la sinapsis con las CCE y la consiguiente activación de un receptor colinérgico presente en la región basal de estas células, bañada por la perilinfa⁸⁸ (Figuras 5 y 6). Este receptor presenta un perfil farmacológico muy particular y permite la rápida entrada de Ca^{++} al citoplasma. Este ingreso de Ca^{++} se traduce en la apertura de canales de K^+ activados por Ca^{++} intracelular⁸⁹ (Figura 6). La activación de estos canales lleva a la hiperpolarización de la membrana. Esta es, por lo tanto, una transmisión sináptica colinérgica rápida con carácter inhibitorio⁹⁰.

La actividad de las fibras eferentes controla el estado mecánico de la cóclea y reduce la sensibilidad y la sintonización de las fibras aferentes auditivas⁹¹. Más aún, favorecería la detección de señales sonoras particularmente en ambientes ruidosos que pueden enmascararlo⁹² y estaría involucrada en la protección del oído interno ante el trauma acústico. Por otro lado, este sistema se activaría reduciendo la respuesta coclear al estímulo auditivo durante la ejecución de tareas que requieren atención focalizada en otros sentidos⁹³.

⁸⁵ (Holley, 1996; Weiss, 1982)

⁸⁶ (Guinan et al., 1983)

⁸⁷ (Liberman, 1980)

⁸⁸ (Fuchs and Murrow, 1992; Guth et al., 1976)

⁸⁹ (Dulon and Lenoir, 1996; Erostequi et al., 1994; Nenov et al., 1996)

⁹⁰ (Oliver et al., 2000)

⁹¹ (Rajan, 1988; Wiederhold and Kiang, 1970)

⁹² (Nieder and Nieder, 1970)

⁹³ (Oatman, 1976)

La gran relevancia dentro de la fisiología auditiva de las CCE y su modulación eferente se ve reflejada en el hecho de que la interrupción por el daño de las CCE, de la interacción entre la membrana basilar y estas células, es una de las causas más frecuentes de sordera de origen neurosensorial en el ser humano⁹⁴.

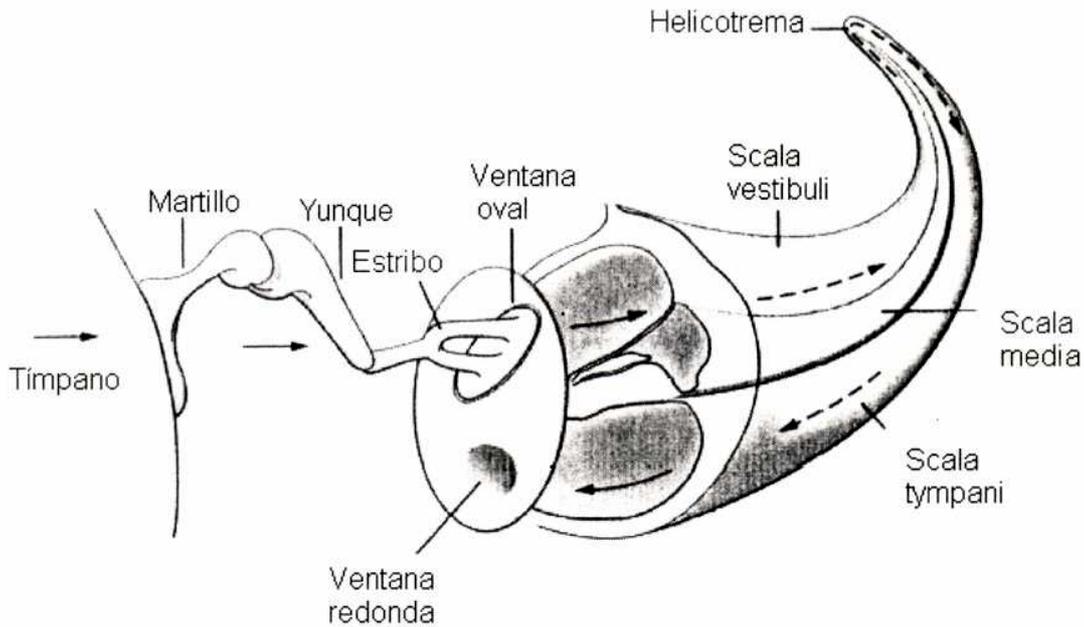
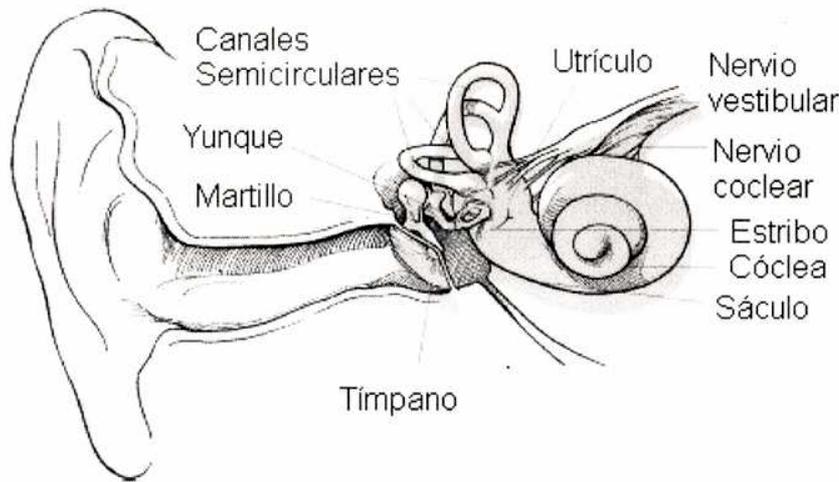


Figura 4: El oído interno y la cóclea

Arriba: En el oído interno (*sombreado*) se encuentran la cóclea o caracol, el utrículo, el sáculo y los tres canales semicirculares. Estas tres últimas estructuras forman el aparato vestibular.

Abajo: Esquema de la cóclea desenrollada, con sus tres cavidades (*scala vestibuli*, *scala media* y *scala tympani*). En el centro, a lo largo de toda la cóclea, ilustrada en trazo oscuro, la membrana basilar. En el dibujo se pueden ver también los huesillos del oído medio y las ventanas oval y redonda en la base de la cóclea.

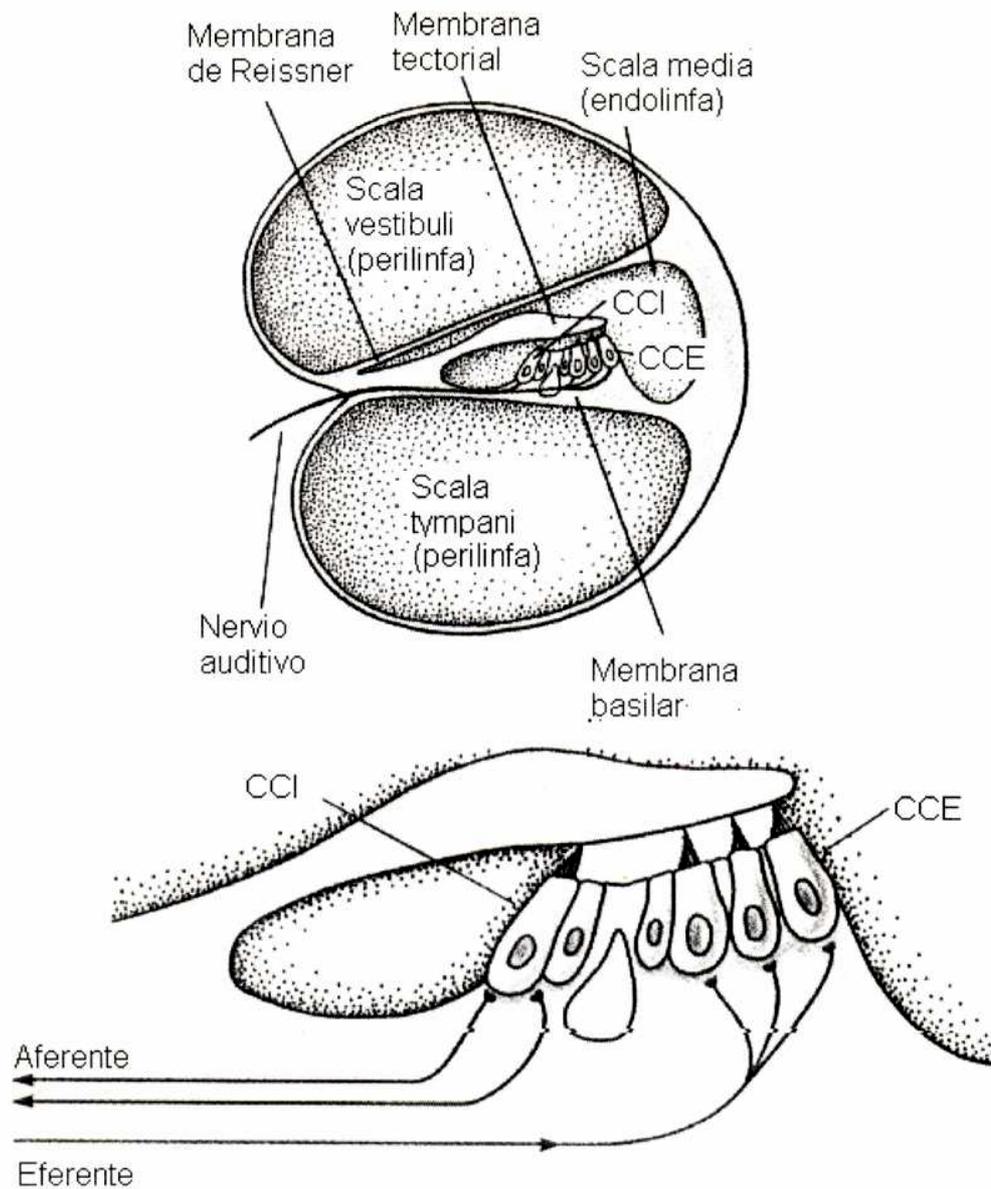


Figura 5: El órgano de Corti y las células ciliadas

Arriba: Sección de la cóclea mostrando las tres cavidades y en el centro, sobre la membrana basilar, el órgano de Corti.

Abajo: Vista ampliada del órgano de Corti. Se diferencian dos tipos de células ciliadas: internas (CCI, una fila) y externas (CCE, tres filas), además de células de soporte.

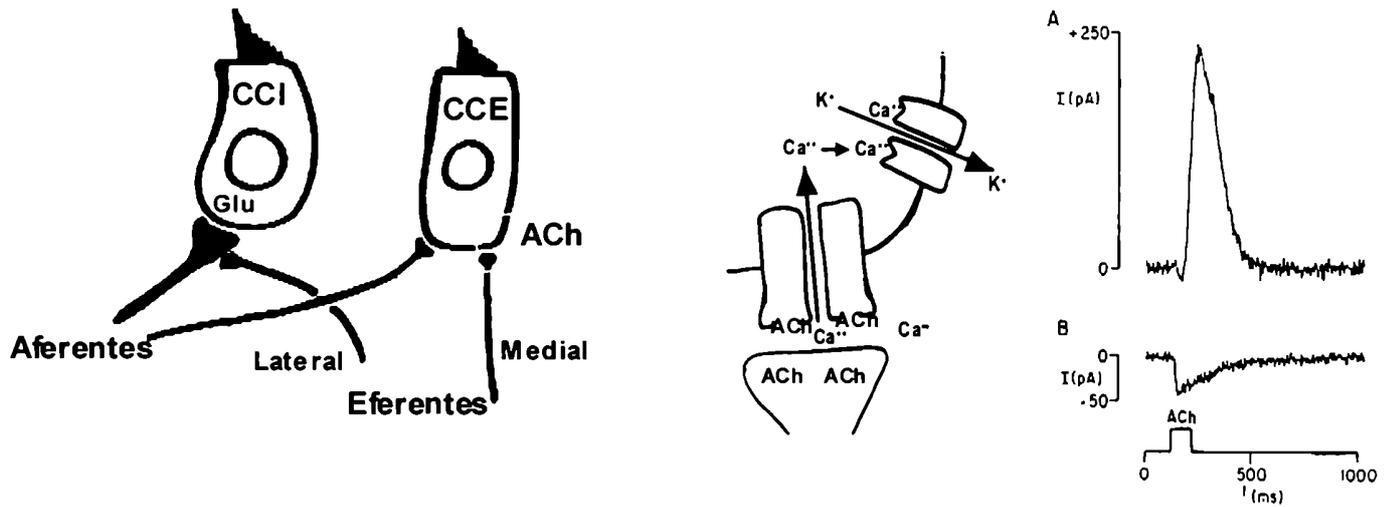


Figura 6 - Inervación de las células ciliadas de la cóclea.

Inhibición colinérgica de las CCE.

En el esquema se muestra la inervación aferente y eferente sobre las CCI y CCE de la cóclea. El recuadro ampliado ilustra la entrada de Ca^{++} a través de canales activados por ACh, lo que conduce a la apertura de canales de K^+ dependientes de Ca^{++} . Se reproducen registros de corrientes evocadas por ACh en células ciliadas: en ausencia de quelante de Ca^{++} intracelular (A) se observa la corriente saliente de K^+ ; en presencia del quelante, queda evidenciada la corriente catiónica entrante, debida al receptor colinérgico (Fuchs, P. A., Morrow, B. W., 1992).

1.6]

El aparato vestibular del oído interno: el órgano del equilibrio

El sentido del equilibrio en los vertebrados es mediado en parte por las células ciliadas vestibulares (CCV). En los mamíferos las CCV se localizan en las paredes de las cavidades llenas de fluido del aparato del oído interno.

Así como las ondas de presión en la cóclea provocadas por la vibración de la ventana oval producen el movimiento de las ciliias de las CCI, la aceleración debida al movimiento y al campo gravitatorio proveen la fuerza que mueve las ciliias de las CCV.

El aparato vestibular consiste en dos órganos otolíticos en forma de sacos, el utrículo y el sáculo, y tres canales semicirculares orientados en tres planos perpendiculares que se conectan con el utrículo en sus bases⁹⁵.

En el extremo de cada canal existe una cámara llamada ámpula, en ellas se ubican las crestas que consisten en una masa gelatinosa llamada cúpula en la cual se encuentran embebidas las ciliias de las CCV. La cúpula obtura la cavidad del ámpula.

En el utrículo y el sáculo existe una estructura diferente del ámpula llamada mácula. Cada mácula consiste en una masa gelatinosa, la membrana otolítica, en la cual se encuentran en suspensión pequeños cristales de CaCO_3 (otolitos). Bajo la membrana otolítica se ubican CCV cuyas ciliias están embebidas en la membrana.

Los extremos basales de las CCV de las crestas y las máculas hacen contacto sináptico con fibras aferentes de la división vestibular del nervio vestibulococlear.

⁹⁵ (Gannong, 1999)

La aceleración rotacional en el plano de cualquiera de los tres canales semicirculares estimula las CCV de sus crestas. Debido a su inercia la endolinfa se desplaza en oposición a la dirección de la rotación. El fluido en movimiento deforma la cúpula, doblando las cilias de las CCV.

Las CCV de las máculas responden a la aceleración lineal. La aceleración en cualquier dirección causa el desplazamiento de estos cristales en sentido opuesto, moviendo las cilias de las CCV. También existe un disparo tónico de las CCV de las máculas en ausencia de movimientos de cabeza, debido a la acción de la gravedad sobre los otolitos.

Han sido descritas dos clases de CCV en mamíferos, aves y reptiles: CCV I y CCV II. Las CCV II son similares a las CCI en cuanto que reciben aferentes con botones sinápticos. En contraste, las CCV I tienen sinapsis con aferentes en forma de cáliz. Estos dos tipos celulares también difieren en las propiedades de las cilias y en su morfología⁹⁶.

La ACh es el neurotransmisor liberado por neuronas eferentes en el oído interno, que en el aparato vestibular hacen sinapsis axosomáticas únicamente con CCV II⁹⁷ (Figura 7). La ACh es capaz de hiperpolarizar las CCV II⁹⁸. Se ha demostrado que la ACh es capaz tanto de facilitar como de inhibir el disparo aferente en el aparato vestibular de la rana y se cree que la inhibición es mediada por la activación de receptores que contienen la subunidad $\alpha 9$ en las CCV⁹⁹. Al igual que en CCE, en CCV la entrada de Ca^{++} a través del receptor colinérgico ionotrópico lleva a la activación de canales de K^+ activados por Ca^{++} intracelular con la consiguiente hiperpolarización de la

⁹⁶ (Eatock et al., 1998)

⁹⁷ (Holt et al., 2000; Kong et al., 1997)

⁹⁸ (Holt et al., 2000)

⁹⁹ (Guth et al., 1986; Hiel et al., 1996; Norris et al., 1988; Perin et al., 1998; Sugai et al., 1992)

membrana. La hiperpolarización lleva a una disminución en la liberación de neurotransmisor por las CCV¹⁰⁰.

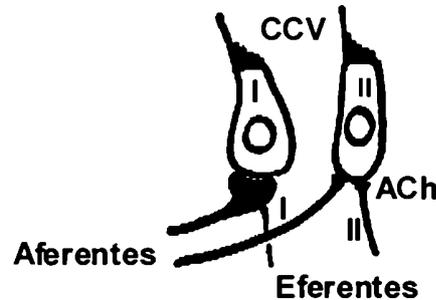


Figura 7 - Inervación de las CCV

El esquema muestra la inervación aferente y eferente sobre las CCV de tipo I y II. Sólo las CCV II reciben inervación colinérgica eferente

1.7]

Las subunidades nicotínicas $\alpha 9$ y $\alpha 10$ y su participación en el receptor colinérgico de las células ciliadas de la cóclea y el aparato vestibular

Desde la descripción de la ACh como el principal neurotransmisor de la sinapsis entre las fibras eferentes y las CCE¹⁰¹ (Figura 6) y durante cerca de un cuarto de siglo, se buscó sin éxito identificar el receptor colinérgico presente en las CCE y CCV (asumiendo que fuera el mismo).

Desde un principio se propuso que este receptor podría pertenecer tanto a la familia de receptores acoplados a proteínas G, como a la de canales iónicos activado por ligando. Sin embargo no se lo pudo clasificar

¹⁰⁰ (Guth et al., 1998; Housley et al., 1989; Sugai et al., 1992)

¹⁰¹ (Eybalin, 1993) y referencias allí citadas.

farmacológicamente de manera concluyente como nicotínico o como muscarínico¹⁰².

Se observó que el receptor colinérgico de las CCE es activado no sólo por ACh, sino también por el agonista colinérgico carbacol, los agonistas nicotínicos DMPP y suberildicolina y el agonista muscarínico oxotremorina-M. Por otro lado el agonista prototípico nicotina no sólo no es capaz de generar respuestas mediadas por este receptor, sino que antagoniza las producidas por la ACh. Además este receptor es bloqueado por antagonistas nicotínicos como la d-tubocurarina y la α -bungarotoxina, antagonistas muscarínicos como la atropina y el antagonista glicinérgico estricnina. Esta farmacología atípica llevó a postular que el receptor colinérgico de las células ciliadas era de un subtipo desconocido¹⁰³ no clonado hasta ese momento.

En 1994 Elgoyhen et al.¹⁰⁴ clonaron un miembro de la familia de genes de los receptores nicotínicos de vertebrados hasta entonces desconocido, la subunidad $\alpha 9$ de rata.

La secuencia aminoacídica de esta subunidad (457 aminoácidos precedidos por un péptido señal de 22) presenta una alta homología con las otras subunidades de receptores nicotínicos e incluye también los característicos cuatro segmentos hidrofóbicos M1-M4, así como los residuos conservados de cisteína en las posiciones 133, 147, 197 y 198 (numeración $\alpha 9$, alineados con las posiciones 128, 142, 192 y 193 de $\alpha 1$).

Sin embargo, mientras que las subunidades neuronales nicotínicas $\alpha 2$ - $\alpha 8$ y la subunidad muscular $\alpha 1$ comparten una identidad de secuencia de entre 48

¹⁰² (Guth, 1996)

¹⁰³ (Erostequi et al., 1994; Fuchs and Murrow, 1992)

¹⁰⁴ (Elgoyhen et al., 1994)

y 70 %, la identidad entre $\alpha 9$ y las subunidades $\alpha 1$ - $\alpha 8$ y $\beta 1$ - $\beta 4$ es menor a 39 %. Esto sugiere que $\alpha 9$ es un miembro distante de la familia (Tabla 3).

La aplicación de ACh sobre ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con ARNc $\alpha 9$, sometidos a fijación de voltaje, resulta en la aparición de un rápido pico de corriente entrante que decae en pocos segundos a una meseta sin desensibilización posterior importante (Figura 8). Esta respuesta, propia de un receptor nicotínico es dependiente de la concentración de ACh ($EC_{50} = 10 \mu M$, $n_H = 1.3$)¹⁰⁵.

Este receptor recombinante presenta una farmacología atípica (Figura 8). Ni la nicotina ni la muscarina producen respuestas en ovocitos que expresan $\alpha 9$. El agonista nicotínico dimetilfenilpiperazonio (DMPP) y el muscarínico oxotremorina-M producen respuestas del ~5% de las alcanzadas con ACh. Además, la respuesta del receptor $\alpha 9$ a la ACh es bloqueada por el antagonista nicotínico d-tubocurarina, el antagonista muscarínico atropina y el antagonista de receptores de glicina estriquina. La α -bungarotoxina, una toxina que bloquea en forma irreversible al receptor nicotínico de la placa neuromuscular y al receptor nicotínico neuronal $\alpha 7$, también es capaz de bloquear al receptor recombinante $\alpha 9$, pero en forma reversible¹⁰⁶.

Por otra parte se reportó que el receptor $\alpha 9$ sería un canal catiónico no selectivo, permeable a Ca^{++} y con una relación I-V no lineal (Figura 8)¹⁰⁷.

Experimentos de hibridación *in situ*¹⁰⁸ y de transcripción reversa sobre ARNm de célula única combinada con reacción en cadena de la polimerasa

¹⁰⁵ (Elgoyhen et al., 1994)

¹⁰⁶ (Elgoyhen et al., 1994)

¹⁰⁷ (Elgoyhen et al., 1994)

¹⁰⁸ (Anderson et al., 1997; Athas et al., 1997; Athas et al., 1997; Elgoyhen et al., 1994; Hiel et al., 1996; Hiel et al., 2000; Luo et al., 1998; Lustig et al., 1999; Morley et al., 1998; Park et al., 1997)

(*single cell RT-PCR*)¹⁰⁹ mostraron la presencia de transcritos de $\alpha 9$ en la pars tuberalis de la pituitaria, el epitelio olfatorio, la lengua, músculo esterno hiodeo, células de la médula espinal, células sanguíneas embrionarias y notablemente en las CCI, CCE y CCV del oído interno. También se reportó la expresión de $\alpha 9$ en condrocitos y osteoblastos en la cóclea del embrión de rata, lo que estaría mostrando una posible función de $\alpha 9$ distinta a su participación en las CCE de la cóclea¹¹⁰.

El perfil de expresión del ARNm $\alpha 9$ y las características farmacológicas del receptor homomérico $\alpha 9$ llevaron a utilizar como hipótesis de trabajo desde el año 1994 al 2001 la suposición de que la subunidad $\alpha 9$ sería el único o, al menos, un componente fundamental del receptor colinérgico ionotrópico nativo de las células ciliadas del órgano de Corti y aquel del aparato vestibular¹¹¹. Más aún, la desaparición de la inhibición de la respuesta coclear mediada por la activación de los eferentes olivococleares en un ratón mutante nulo para el gen $\alpha 9$, ha demostrado que esta subunidad es un componente fundamental del receptor colinérgico nativo de las CCE¹¹².

En 2001 Elgoyhen et al.¹¹³ identificaron y clonaron una nueva subunidad nicotínica de rata con un alto grado de homología con $\alpha 9$ (57 % de identidad) y las mismas características generales comunes a todas las secuencias de subunidades nicotínicas α . La comparación de las secuencias de $\alpha 9$ y $\alpha 10$ entre sí y con las demás subunidades α , sugiere la existencia de tres subfamilias evolutivamente relacionadas, siendo la subunidad $\alpha 10$ la

¹⁰⁹ (Glowatzki et al., 1995)

¹¹⁰ (Luo et al., 1998)

¹¹¹ (Evans, 1996; Guth, 1996; Katz et al., 2000; Lawlor et al., 1999; Luo et al., 1998; Rothlin et al., 1999; Vetter et al., 1999; Zuo et al., 1999)

¹¹² (Vetter et al., 1999)

¹¹³ (Elgoyhen et al., 2001)

más semejante a $\alpha 9$ y formando una subfamilia con $\alpha 1$, $\alpha 7$, $\alpha 8$ (de pollo) y $\alpha 9$.

No es posible observar respuestas en ovocitos inyectados únicamente con ARNc $\alpha 10$. No obstante, la inyección de una mezcla equimolar de ARNc $\alpha 9$ y $\alpha 10$ (ARNc $\alpha 9:\alpha 10$), resulta en la expresión de un receptor colinérgico funcional. El perfil farmacológico de este receptor sería en principio muy similar al del receptor homomérico $\alpha 9$ descrito aquí. Sin embargo sus características biofísicas lo distinguen claramente del receptor homomérico $\alpha 9$.

Las corrientes despolarizantes obtenidas con ovocitos inyectados con ARNc $\alpha 9:\alpha 10$ en respuesta a la aplicación de ACh ($EC_{50} = 13.8 \mu M$) fluctúan entre los 200 y 5000 nA¹¹⁴ (Figura 9), en contraste con las respuestas del receptor homomérico $\alpha 9$ que promedian los 50 nA y rara vez superan los 200 nA¹¹⁵ (las respuestas son 80-90 % menores en presencia intracelular del quelante de Ca^{++} BAPTA, en ambos casos). Es probable que las corrientes de mayor amplitud se deban a una mayor eficiencia en el ensamblado del receptor $\alpha 9:\alpha 10$ y/o en la inserción del mismo en la membrana del ovocito, a una tasa de recambio más baja, a que la subunidad $\alpha 10$ altere las propiedades biofísicas del receptor en ese sentido o a una combinación de dos o más de dichos factores.

Al igual que el receptor homomérico $\alpha 9$, el heteromérico $\alpha 9:\alpha 10$ presenta un potencial de reversión compatible con un canal catiónico inespecífico y una marcada rectificación alrededor de ese valor, sin embargo los canales

¹¹⁴ (Elgoyhen et al., 2001)

¹¹⁵ (Elgoyhen et al., 1994; Katz et al., 2000; Rothlin et al., 1999; Verbitsky et al., 2000)

$\alpha 9:\alpha 10$ pasan sustancialmente más corriente que los $\alpha 9$ a potenciales hiperpolarizados (Figura 9).

Los receptores $\alpha 9$ y $\alpha 9:\alpha 10$ también difieren en cuanto a su cinética de desensibilización (Figura 9). Las respuestas de $\alpha 9:\alpha 10$ se reducen marcadamente en presencia continua de ACh. Más aún, se observa una progresiva reducción del pico máximo de respuesta con aplicaciones sucesivas de ACh 100 μM en pulsos de 10 seg separados por un intervalo de lavado de 30 s. Esta desensibilización puede interpretarse en términos de la estabilidad relativa de estados desensibilizados y cerrados del receptor y de la cinética de transición entre ellos¹¹⁶. Se ha postulado para el receptor nicotínico muscular un modelo en el que sucesivos estados desensibilizados son alcanzados secuencialmente, cada uno requiriendo tiempos más largos en ausencia de agonista para retornar al estado cerrado activable¹¹⁷. Esta desensibilización no se observa en $\alpha 9$ ¹¹⁸.

Por otra parte experimentos de hibridación *in situ* demostraron la presencia de transcritos de $\alpha 10$ en CCE, CCI y CCV de embriones y neonatos de rata. A diferencia de lo observado para $\alpha 9$, los niveles de ARNm $\alpha 10$ en CCI comienzan a disminuir en el estadio postnatal 13 y desde el 21 desaparecen completamente de dicho tipo celular. Mientras que en las ratas adultas $\alpha 10$ también se expresa en las CCE, no se ha detectado $\alpha 10$ en la *pars tuberalis* de la pituitaria, el epitelio olfatorio, la lengua y el músculo esterno hiodeo.¹¹⁹

¹¹⁶ (Galzi et al., 1996)

¹¹⁷ (Reitstetter et al., 1999)

¹¹⁸ (Elgoyhen et al., 2001)

¹¹⁹ (Elgoyhen et al., 2001)

Todos estos hallazgos estarían indicando que el receptor nativo de las CCE podría ser, no el homómero $\alpha 9$, sino el heterómero $\alpha 9:\alpha 10$.

Las características biofísicas del receptor nativo, coincidentes con las de $\alpha 9:\alpha 10$, abogan a favor de esta hipótesis recientemente propuesta . No obstante tanto en las CCI como en otros tejidos o tipos celulares podría existir el receptor homomérico $\alpha 9$.

A la luz de estos resultados y dado que no se ha reportado el ensamblado de $\alpha 9$ con otras subunidades nicotínicas ($\alpha 1-\alpha 8$ y $\beta 1-\beta 4$), es posible postular la existencia de dos tipos de receptores que incluyen a la subunidad $\alpha 9$: receptores homoméricos $\alpha 9$ y heteroméricos $\alpha 9\alpha 10$.

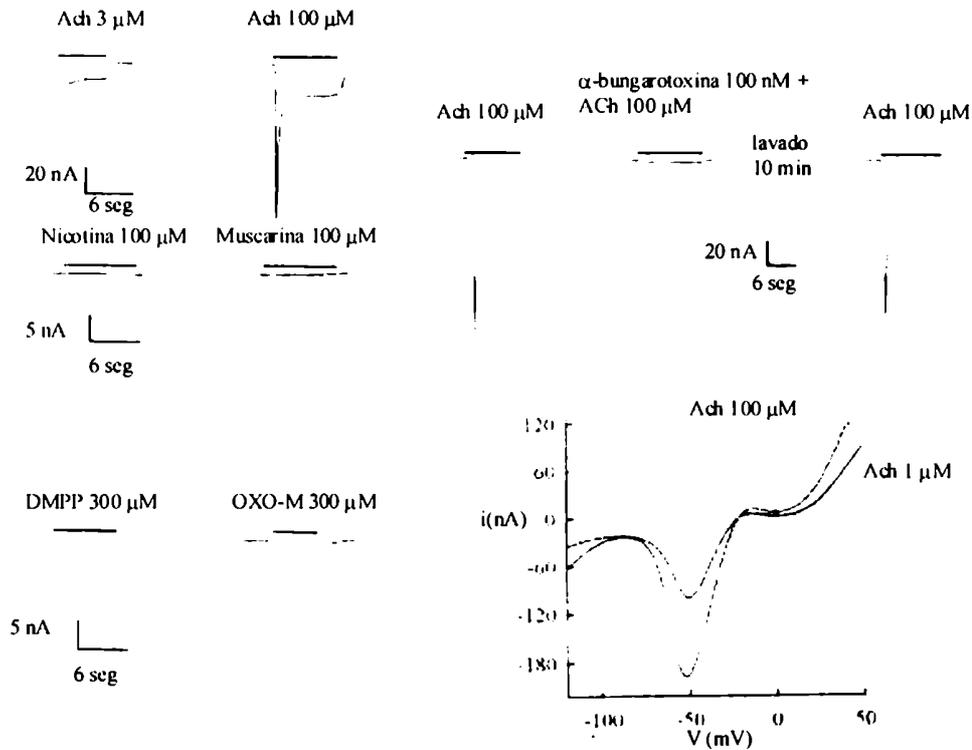


Figura 8: Estudio preliminar del receptor homomérico $\alpha 9$ expresado en ovocitos de *Xenopus laevis*. (Elgoyhen, A. B. et al. Cell, 79:705-715, 1994)

Izquierda arriba: Respuestas evocadas por ACh en ovocitos inyectados con ARNc $\alpha 9$ ($EC_{50} = 10 \mu M$). Ni la nicotina ni la muscarina fueron capaces de producir respuestas.

Izquierda abajo: Respuestas evocadas por el agonista nicotínico DMPP y por el agonista muscarínico oxotremorina-M (OXO-M).

Derecha arriba: La α -bungarotoxina (100 nM) bloquea reversiblemente las respuestas del receptor $\alpha 9$.

Derecha abajo: Variación de la respuesta evocada por ACh con el potencial de membrana en ovocitos inyectados con ARNc $\alpha 9$. Las curvas fueron obtenidas por aplicación de una rampa de voltaje durante la meseta de la respuesta a ACh 1 μM o 100 μM .

Las corrientes fueron medidas utilizando el método de fijación de voltaje con dos electrodos.

EC_{50} : concentración efectiva para alcanzar el 50% de la respuesta máxima.

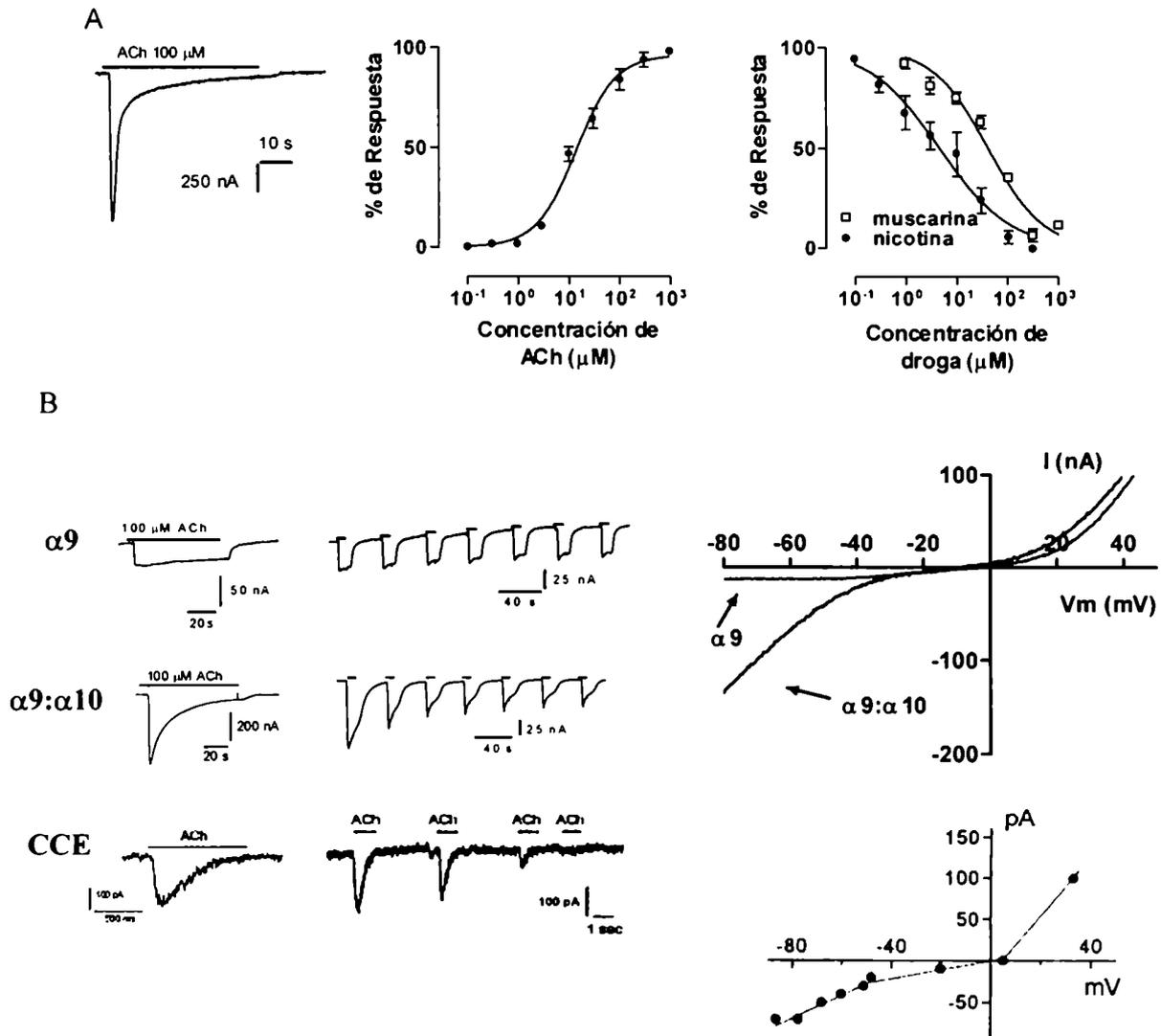


Figura 9: El receptor heteromérico $\alpha 9:\alpha 10$ y el receptor homomérico $\alpha 9$ comparten propiedades farmacológicas pero difieren en sus características biofísicas.

A- Izquierda: Respuesta a ACh 10 μM de un ovocito inyectado con una mezcla equimolar de ARNc $\alpha 9$ y $\alpha 10$. *Centro:* Curva concentración - respuesta a ACh del receptor $\alpha 9:\alpha 10$ ($EC_{50} = 13.8 \mu\text{M}$). *Derecha:* Curvas de inhibición por nicotina y muscarina de las respuestas evocadas por ACh 10 μM en ovocitos que expresan el receptor $\alpha 9:\alpha 10$.

B- Respuestas evocadas por aplicación prolongada (izquierda) o repetida (centro) de ACh en ovocitos inyectados con ARNc $\alpha 9$ (arriba), ovocitos inyectados con ARNc $\alpha 9$ y $\alpha 10$ (centro) y CCEs (abajo).

Derecha: Curvas corriente potencial para los receptores $\alpha 9$ y $\alpha 9:\alpha 10$ (arriba) y para el receptor nativo de CCEs (abajo). ($\alpha 9$ y $\alpha 9:\alpha 10$: Elgoyhen et al. PNAS. 98: 3501-3506, 2001; CCE: Dulon et. al. Eur. J. Neurosci. 8:1945-1952, 1996)

2]

OBJETIVOS

- Realizar una extensa caracterización farmacológica muscarínica - nicotínica del receptor homomérico $\alpha 9$ expresado en ovocitos de *Xenopus laevis*.
- Estudiar el efecto de opioides sobre los receptores $\alpha 9$ y $\alpha 9:\alpha 10$.
- Iniciar la caracterización del efecto de los iones divalentes sobre las corrientes evocadas por ACh en el receptor $\alpha 9$.
- Identificar determinantes estructurales responsables de funciones específicas de las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ mediante la construcción de subunidades quiméricas y de la mutagénesis dirigida.

3]

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1]

Expresión de receptores recombinantes en ovocitos de *Xenopus laevis* y registros electrofisiológicos (Figura 10)

3.1.1]

Producción de ARNc

Los ADNc de $\alpha 9$, $\alpha 10$, 5HT_{3A}, mutantes puntuales de $\alpha 9$, mutantes puntuales de $\alpha 10$, y construcciones quiméricas (ver más abajo) fueron insertados u obtenidos en el plásmido pGEMHE, un vector que, para optimizar la expresión en ovocitos de *Xenopus laevis*, incluye en los flancos del segmento de múltiples sitios de clonado (*polylinker*) secuencias de regiones no traducidas 5' y 3' del gen que codifica para la β -globina de *Xenopus laevis*¹²⁰. Los distintos plásmidos fueron linealizados cortando en un único sitio en el extremo 3' del segmento de múltiples sitios de clonado (*polylinker*) del vector, utilizando la endonucleasa de restricción NheI (New England Biolabs Inc., EE.UU.) 0.5 U/ μ l; posteriormente tratados con proteínasa K (Sigma, EE.UU.) 100 μ g/ml por 30 min a 50° C; sometidos a extracción con fenol:CHCl₃; precipitados con EtOH y CH₃COONH₄ y resuspendidos en H₂O libre de ARNasa. Los ARNc se obtuvieron mediante transcripción *in vitro* a partir de los plásmidos linealizados utilizando el mMessage Machine T7 transcription kit (Ambion Inc., EE.UU). Las

¹²⁰ (Liman et al., 1992)

reacciones de transcripción se realizaron en presencia de un análogo de la caperuza (*cap*): Me⁷G(5')ppp(5')G en proporción 4:1 con respecto a GTP.

3.1.2]

Obtención y mantención de ovocitos. Procedimientos generales para la expresión heteróloga de los receptores recombinantes y registro electrofisiológico

Los ovocitos fueron extraídos quirúrgicamente de los ovarios de *Xenopi l.* anestesiadas con ~ 1 g/ml de 3-aminobenzoato de etilo (Sigma Co., EE.UU.), fueron luego separados uno a uno con pinzas o por incubación con colagenasa tipo I (Worthington, EE.UU.) 2 mg/ml 30 min a 20°C en una solución salina libre de Ca²⁺ (NaCl 96 mM, KCl 2 mM, MgCl₂ 5 mM, HEPES 5 mM, pH 7.6). Los ovocitos fueron inyectados con 1-10 ng (50 nl) de ARNc utilizando una pipeta de microinyección. Los registros electrofisiológicos se realizaron de 2 a 7 días después de la inyección mediante el método de fijación de voltaje con dos electrodos (TEVC, *two-electrode voltage clamp*) utilizando un amplificador Oocyte Clamp OC-725B (Warner Instruments Corp., EE.UU.) conectado a una PC a través de un conversor analógico/digital digital/analógico PP-50 Lab (Warner Instruments Corp., EE.UU.). Cada electrodo fue llenado con KCl 3M y los ovocitos bañados con un flujo continuo de solución salina (NaCl 115 mM, CaCl₂ 1.8 mM, KCl 2.5 mM, HEPES 10mM, pH 7.2,) durante el experimento. En los experimentos en que se analizó el efecto de los cationes divalentes, la concentración de CaCl₂, o MgCl₂, fue variada según se indica en las figuras correspondientes. La drogas, disueltas en la misma solución de salina de perfusión, fueron aplicadas en el flujo.

En los experimentos en los que se estudió el efecto de los cationes divalentes los ovocitos se preincubaron con el acetometilester del ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético (BAPTA-AM 100 μ M, Sigma Co., EE. UU.), capaz de atravesar la bicapa lipídica y ser luego hidrolizado en el citoplasma para dar BAPTA, un quelante rápido de Ca⁺⁺.

3.1.3]

Curvas concentración - respuesta

Las curvas concentración respuesta se obtuvieron mediante la aplicación de concentraciones crecientes de agonistas. El valor del pico de cada respuesta fue normalizado refiriendolo al valor del pico de respuesta a una concentración saturante de ACh para cada ovocito. Los valores de concentración necesaria para alcanzar el 50% de la respuesta máxima a cierto agonista (EC₅₀) se calcularon mediante el ajuste de los datos experimentales a una curva sigmoidea descrita por:

$$y = y_{\max} + (y_{\min} - y_{\max}) / (1 + (x/EC_{50})^n)$$

donde "y" representa la respuesta normalizada y "x" la concentración de agonista.

3.1.4]

Curvas de inhibición y desplazamiento:

Las curvas de inhibición se obtuvieron mediante la coaplicación de una concentración fija de ACh y concentraciones crecientes de antagonista. En los casos de MLA, morfina, endomorfina 1 y dinorfina B se preincubó con el antagonista durante 2 min previo a la coaplicación con ACh. La concentración de antagonista necesaria para alcanzar el 50% de inhibición

(IC₅₀) se obtuvo ajustando los datos experimentales a una curva sigmoidea descrita por:

$$y = y_{\min} + (y_{\max} - y_{\min}) / (1 + (x / IC_{50})^n),$$

donde "y" representa la respuesta normalizada y "x" la concentración de agonista.

Las curvas de desplazamiento se obtuvieron mediante la coaplicación de una concentración fija de antagonista y concentraciones crecientes de ACh. En los casos de atropina, morfina, MLA, endomorfina-1 y dinorfina B se preincubó con el antagonista durante 2 min previo a la coaplicación con ACh.

La curva de bloqueo por Ca⁺⁺ se obtuvo midiendo la respuesta a ACh en presencia de concentraciones decrecientes de Ca⁺⁺ extracelular en ovocitos preincubados con BAPTA-AM por 4hs.

3.1.5]

Curvas corriente - potencial:

Para obtener las curvas corriente - potencial (I-V) se generaron rampas de potencial operando el conversor digital/analógico analógico/digital, simultáneamente con la adquisición de datos, mediante el programa Clampex 6.0. El protocolo de estimulación utilizado consistió en una rampa lineal desde +40 a -120 mV para los receptores homoméricos y de -120 a +40 mV para los heteroméricos, con una duración de 2 seg, partiendo de un potencial de sostén ($V_{\text{sostén}}$, *holding potential*) de -70 mV. Las rampas se efectuaron durante la aplicación de ACh, 10 seg luego de observado el pico de la respuesta. Un protocolo alternativo utilizado para medir la relación entre la amplitud de la corriente y el potencial fue obtener respuestas a ACh a distintos $V_{\text{sostén}}$ de la membrana.

3.2]

Mutagénesis dirigida y construcción de ADNc quiméricos

3.2.1]

Mutagénesis dirigida

Las mutaciones puntuales T150 a K y Q261 a M del ADNc $\alpha 9$ se realizaron con el *Altered Sites II in vitro Mutagenesis System* (Promega Corp., EE.UU.). Previamente el ADNc $\alpha 9$ fue insertado en el plásmido pAlter-1 (Promega Corp., EE.UU.) y luego de efectuada la mutación se insertó nuevamente en pGEMHE.

La mutaciones puntual Q261 a M del ADNc $\alpha 10$ se realizó con el *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene , EE.UU.).

Para las citadas mutaciones se diseñaron y utilizaron los siguientes oligonucleótidos iniciadores (*primers*) :

Oligo a9T/K:

5' -ACAGCCAGCAGTGCAACCTGAAGTTTGGATCCTGGACCTACAATGGAAAC-3'

Oligo a9Q/M:

5' -TATTGGCCATGACTGTGTTTATGCTAATGGTGGCGGAGATCATGCCAGCCTCAGA-3'

Oligo a10Q/M:

5' -CCTGGCGCTCACCGTCTTCATGCTGATCCTGGCCGAGAGC-3'

y su complementario antisentido

Haciendo uso de la degeneración del código genético se incluyó en los

oligonucleótidos, cuando fue posible, una mutación silenciosa que al introducir un sitio de corte para una enzima de restricción facilita la detección del genotipo mutante mediante digestión con la correspondiente enzima y electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio.

Todas las mutaciones puntuales fueron confirmadas por secuenciación.

3.2.2]

Construcción de ADNc quiméricos

Las construcciones se realizaron mediante el método de “empalme de genes por extensión de la superposición” (*gene splicing by overlap extension*, Figura 11)¹²¹. En este método se amplifica mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) uno de los fragmentos de genes a empalmar. Uno de los oligonucleótidos iniciadores se sintetiza de manera de contener en su extremo 5' una porción de secuencia correspondiente al otro gen. Se realiza una segunda PCR, análoga a la primera, para amplificar el fragmento del segundo gen. Finalmente se efectúa una tercera reacción en la que los dos fragmentos amplificados anteriormente son a la vez iniciadores y ADN molde. Se incluyeron en los oligonucleótidos mutaciones silenciosas, introduciendo sitios de corte para enzimas de restricción, para facilitar el control de las PCRs. Las construcciones fueron insertadas en el vector pGEMHE, y su secuencia confirmada por secuenciación automática, para lo cual se diseñaron los oligonucleótidos apropiados.

Se construyeron las siguientes quimeras: $\alpha 9(209)5HT_{3A}$, $5HT_{3A}(209)\alpha 9$, $\alpha 9(244)\alpha 7$, $\alpha 7(244)\alpha 9$ y $\alpha 7(244)\alpha 9(271)\alpha 7$.

Los oligonucleótidos empleados fueron:

¹²¹ (Horton et al., 1989)

Oligo PGEMsent:

5' -GGGCGAATTAATTCGAGCTC-3'

Oligo PGEManti:

5' -GCTATGACCATGATTACGCC-3'

Oligo A9(209)5HTsent:

5' -GGTCTCTACAGTGGAAGTGAGAGCAGTAGGCAGCTGCCGAAATAAGATGCGTCAG-3'

y su complementario antisentido

Oligo 5HT(209)A9sent:

5' -GCCTTTACTTCAAGATGCACGAAGACTTCTCCTCCTCGAGGAAGATGTAGCAGTTGGA-3'

y su complementario antisentido

Oligo a9(244)a7sent:

5' -TCCAAGAGAGATTTTCTCTCCCGAGGCTGCTGGGAGATAGAACTCAA-3'

y su complementario antisentido

Oligo a7(244)a9sent

5' -CTGCTGGTATTCTTGCTGCCCGCGGACTCTGGGGAGAAGGTCTCTCTGGG-3'

y su complementario antisentido

Oligo a9(271)a7sent

5' -GCAGAGATCATGCCAGCCTCAGATTCGGTACCCTTGATAGCACAATACTTCGCC-3'

y su complementario antisentido

3.3]

Drogas utilizadas

Las siguientes drogas fueron adquiridas de Sigma Chemical Co. (EE.UU.): Cloruro de acetilcolina (ACh), cloruro de carbamilcolina (carbacol), (-)-citisina, yoduro de 1,1-dimetil-4-fenilpiperazinio (DMPP), dinorfina B, endomorfina 1, 5-hidroxitriptamina (serotonina), dicloruro de suberildicolina, y cloruro de morfina.

Las siguientes drogas fueron adquiridas de RBI (EE.UU.): sulfato de atropina, cloruro de carbamil β -metilcolina (betanecol), cloruro de (\pm)-epibatidina, trietioduro de galamina, McN-A-343, clorhidrato de mecamilamina, cloruro de metilcarbamilcolina (metilcarbacol), yoduro de metilfurtretonio, citrato de metillicaconitina (MLA) di-d-tartrato de (-)-nicotina, clorhidrato de (+)-pilocarpina, diclorhidrato de pirenzepina y clorhidrato de estricnina.

Las soluciones de trabajo de todas las drogas fueron preparadas mediante dilución en solución salina a partir de alícuotas de soluciones madres de concentración ≥ 10 mM conservadas a -20°C .

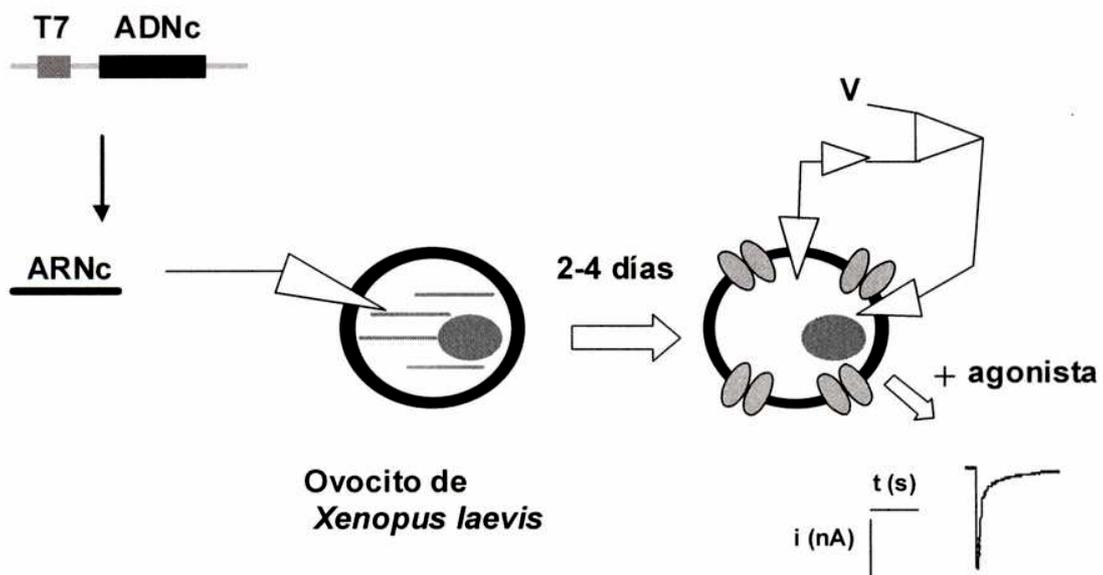


Figura 10 - Expresión de receptores activados por ligando en ovocitos de *Xenopus laevis* y medición de las respuestas por fijación de voltaje con dos electrodos

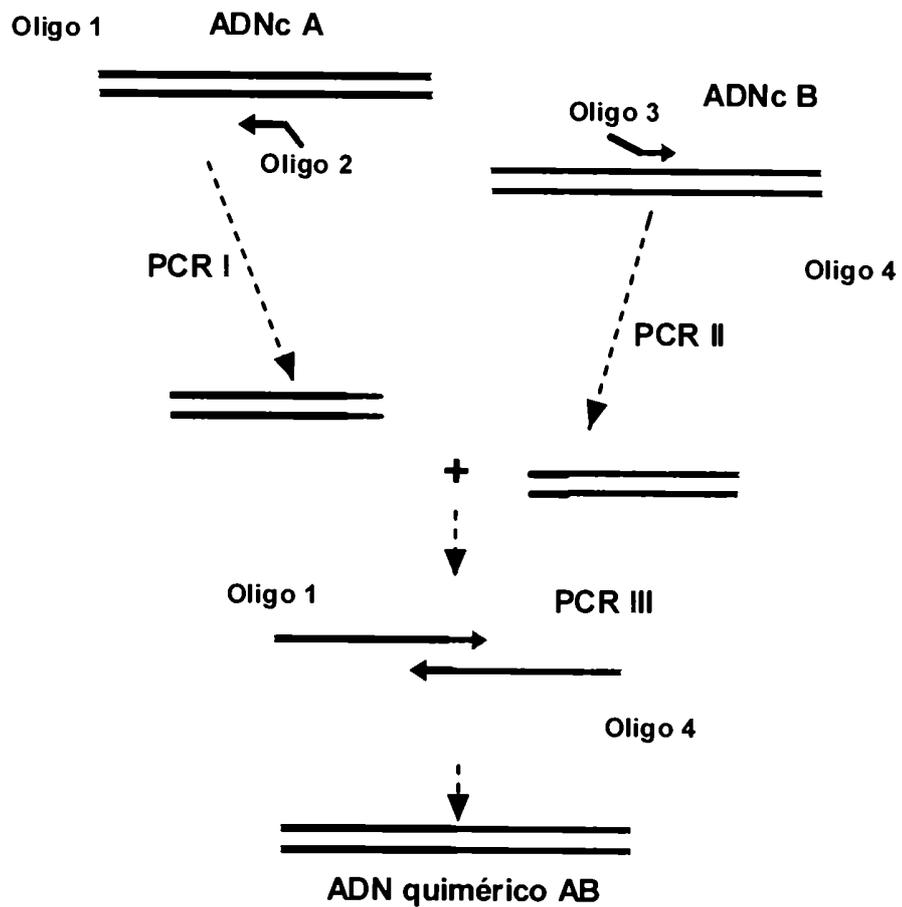


Figura 11 - Obtención de ADNc quiméricos

4]

RESULTADOS

4.1]

Caracterización farmacológica del receptor $\alpha 9$: Un receptor colinérgico ionotrópico con farmacología mixta muscarínica - nicotínica

4.1.1]

*Agonistas colinérgicos inespecíficos, nicotínicos y muscarínicos activan al receptor recombinante $\alpha 9$ expresado en ovocitos de *Xenopus laevis*.*

La aplicación de ACh sobre ovocitos inyectados con ARNc $\alpha 9$ produjo una respuesta que puede registrarse mediante el método de TEVC como una corriente entrante¹²². Esta respuesta alcanza rápidamente un pico que decae a una meseta en pocos segundos (Figura 12). También se observó que el agonista colinérgico inespecífico carbacol es capaz de activar al receptor $\alpha 9$ en forma dependiente de la concentración, alcanzando el 80 % de la respuesta máxima a la ACh. Por otra parte había sido reportada la respuesta a los agonistas nicotínico DMPP y muscarínico oxotremorina M, ambos con una eficacia de ~5%, y la ausencia de respuesta a los agonistas prototípicos nicotina y muscarina¹²³. Se investigó entonces el efecto de distintos agonistas nicotínicos y muscarínicos sobre el receptor recombinante $\alpha 9$. Se

¹²² La convención utilizada actualmente considera al flujo entrante de cationes o saliente de aniones como una corriente de signo negativo, llamada "corriente entrante" y al flujo saliente de cationes o entrante de aniones como una corriente de signo positivo, llamada "corriente saliente".

¹²³ (Elgoyhen et al., 1994).

encontró que los ovocitos inyectados con ARNc $\alpha 9$ responden con respuestas entrantes dependientes de la concentración ante la aplicación de los agonistas nicotínicos metilcarbacol y suberildicolina, y los agonistas muscarínicos McN-A-343¹²⁴ y metilfurtretonio¹²⁵. Mientras que el máximo de respuesta observado con metilcarbacol fue del 80% de la respuesta máxima a ACh, los demás agonistas mencionados se comportaron como agonistas parciales con una eficacia del 22% para el caso de la suberildicolina, 20% para el McN-A-343 y sólo 8% para el metilfurtretonio. Las respuestas a todos los agonistas fueron de la misma forma que la descrita para ACh con excepción de las respuestas a altas concentraciones de McN-A-343 que presentaban un pico inicial seguido por una rápida caída de la respuesta con un rebote de respuesta al lavar el agonista (Figura 12), probablemente debido a la liberación de los receptores $\alpha 9$ de un bloqueo de canal abierto.

Se realizaron curvas concentración - % de respuesta completas para todos los agonistas mencionados anteriormente (Figura 12B). En base a los parámetros calculados a partir de estas curvas se estableció el siguiente orden de potencia para los agonistas de máxima eficacia: ACh ($EC_{50}=11.4\pm 0.8 \mu M$, $n=5$) > metilcarbácol ($EC_{50}=30.4\pm 3.8 \mu M$, $n=5$) > carbacol ($EC_{50}=63.7\pm 13.8 \mu M$, $n=5$). El agonista muscarínico betanecol, otro compuesto muy similar estructuralmente a la ACh, no produjo respuesta en ovocitos inyectados con ARNc $\alpha 9$.

También se observó que la colina, producto de degradación de la ACh, es capaz de activar al receptor recombinante $\alpha 9$ expresado en ovocitos de *Xenopus laevis* (Figura 13).

¹²⁴ (Micheletti and Schiavone, 1990)

¹²⁵ (Blankesteyn et al., 1993; Eltze et al., 1997)

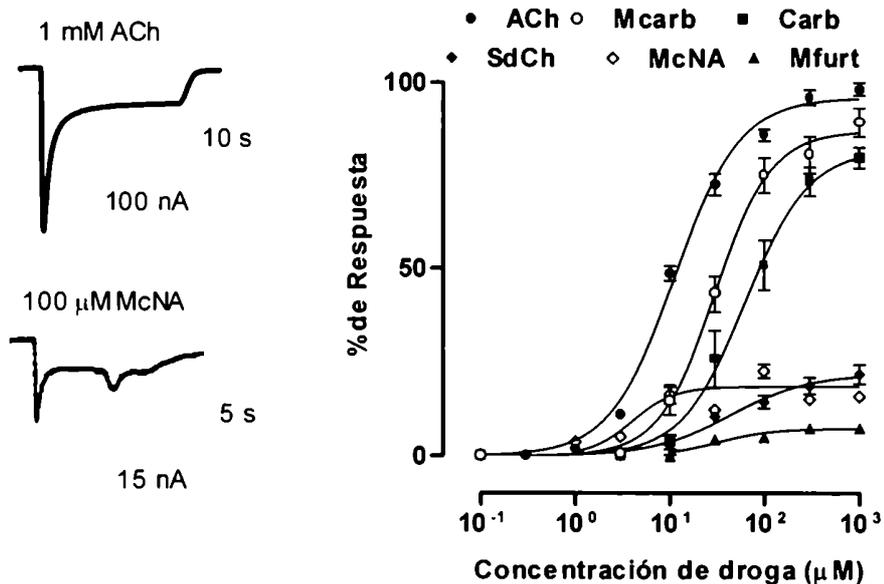


Figura 12 - Agonistas colinérgicos, nicotínicos y muscarínicos activan al receptor homomérico $\alpha 9$

Derecha: Trazos representativos de corrientes evocadas por ACh 1 mM (*arriba*) y McN-A-343 100 μ M (*abajo*) en ovocitos inyectados con ARNc $\alpha 9$.

Izquierda: Curvas concentración - respuesta a ACh, metilcarbacol (Mcarb), carbacol (Carb), suberildicolina (SdCh), McN-A-343 (McNA), y metilfurtretonio (Mfurt). Los valores pico de corriente fueron normalizados y referidos a las respuestas pico máximas a ACh. Cada punto representa el promedio \pm error estándar (n = 3 a 5)

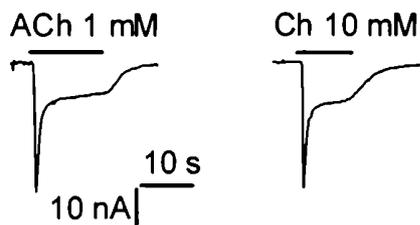


Figura 13 – Activación del receptor $\alpha 9$ por colina

Trazos representativos mostrando la respuesta a ACh 1 mM y colina (Ch) 10 mM de un mismo ovocito inyectado con ARNc $\alpha 9$

4.1.2]

Agonistas nicotínicos clásicos bloquean la respuesta del receptor $\alpha 9$ a la ACh

Cómo fuera descrito previamente¹²⁶ el agonista clásico nicotínico nicotina no produce respuesta en ovocitos inyectados con ARNc $\alpha 9$. Sin embargo bloquea reversiblemente la respuesta evocada por ACh (Figura 14A). El mismo comportamiento se observó para otros típicos agonistas nicotínicos: la epibatidina y la citisina (Figura 14A). Se realizaron curvas de inhibición para estos tres primeros compuestos encontrándose que el rango de potencia es: epibatidina ($IC_{50}=1.6\pm 0.1 \mu M$, $n=7$) > nicotina ($IC_{50}=31.5\pm 1.0 \mu M$, $n=4$) > citisina ($IC_{50}=43.1\pm 3.5 \mu M$, $n=3$) (Figura 14B). Para una mejor caracterización de estos efectos se estudió la inhibición de la respuesta a concentraciones crecientes de ACh (Figura 15). Dada la reversibilidad de la inhibición observada, la imposibilidad de neutralizar el efecto bloqueante del antagonista a concentraciones máximas del agonista sería un fuerte indicio de una interacción de tipo no competitivo, es decir que los dos compuestos se unirían a sitios bien diferenciados en el receptor. Por el contrario un desplazamiento paralelo de la curva concentración - respuesta alcanzando un mismo efecto máximo pero con disminución en la potencia, es indicativo de una interacción de tipo competitiva y probablemente de que agonista y antagonista interactuarían con sitios de unión al menos parcialmente superpuestos. Este último caso fue lo observado para el bloqueo del receptor $\alpha 9$, tanto por nicotina como por citisina y epibatidina, de lo que puede inferirse un mecanismo de tipo competitivo como el más plausible. En los tres casos se verificó un aumento estadísticamente significativo en los

¹²⁶ (Elgoyhen et al., 1994)

valores de EC_{50} de ACh: de 11.7 ± 1.2 a 67.4 ± 7.5 μM ($n=4$, $p<0.05$) en presencia de nicotina 100 μM , de 9.9 ± 0.5 a 29.9 ± 2.4 μM ($n=3$, $p<0.05$) en presencia de citisina 100 μM y de 11.7 ± 1.2 a 19.8 ± 1.8 μM ($n=3$, $p<0.05$) en presencia de epibatidina 1 μM . Al mismo tiempo no se observaron cambios significativos ni en las respuestas máximas ni en los coeficientes de Hill.

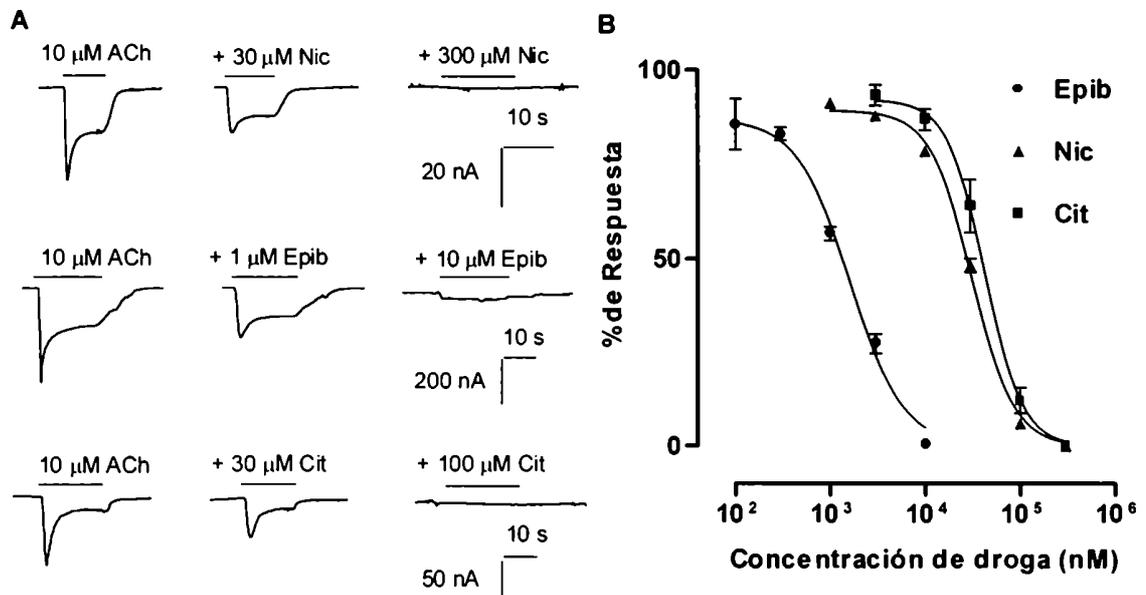


Figura 14 - Bloqueo del receptor $\alpha 9$ por agonistas nicotínicos clásicos

A: Trazos representativos de corrientes evocadas por ACh 10 μM sola o en presencia de nicotina (Nic), epibatidina (Epib) o citisina (Cit). *B*: Curvas de inhibición realizadas por coaplicación de ACh 10 μM y concentraciones crecientes de las drogas indicadas. Los valores de picos de corriente fueron normalizados y referidos con respecto al pico de corriente evocada por ACh 10 μM para cada ovocito. Cada punto representa el promedio \pm error estándar ($n = 3$ a 5)

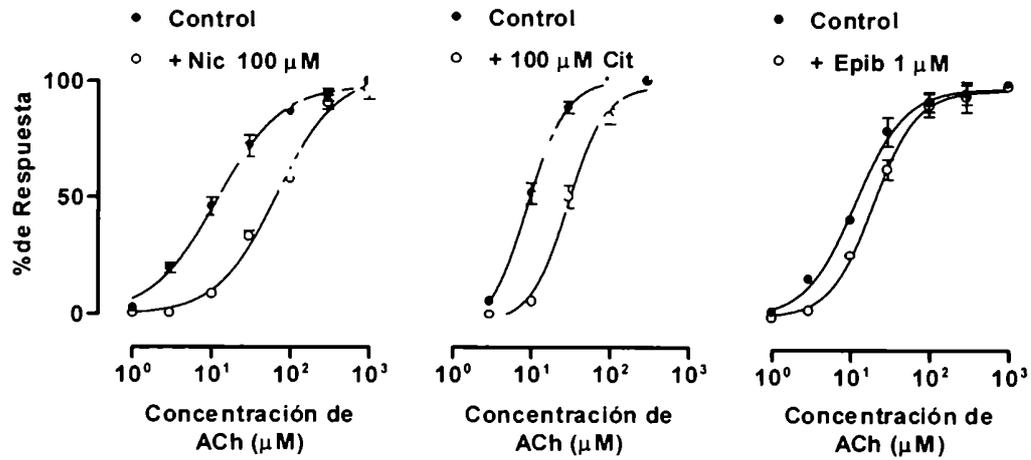


Figura 15 - Desplazamiento de la curva concentración - respuesta a ACh en presencia de agonistas nicotínicos clásicos

Curvas concentración - respuesta a ACh sola (control) o en presencia de nicotina (Nic) 100 μM, citisina (Cit) 100 μM o epibatidina (Epib) 1 μM. Los valores pico de corriente fueron normalizados y referidos a la respuesta máxima a concentración saturante de ACh. Cada punto representa el promedio ± error estándar (n = 3 a 4).

4.1.3]

Antagonistas nicotínicos inhiben la respuesta del receptor $\alpha 9$ a ACh, siendo la metillicaconitina el más potente

Se investigó la sensibilidad relativa del receptor $\alpha 9$ a distintos antagonistas nicotínicos. Se encontró que los antagonistas no selectivos nicotínicos mecamilamina y DH β E bloquean reversiblemente las corrientes producidas por la ACh en ovocitos inyectados con ARNc $\alpha 9$ con IC₅₀ de 8.5 \pm 0.9 μ M (n=3) y 24.2 \pm 1.4 μ M (n=6) respectivamente (Figura 16A). Asimismo tanto el bloqueante neuromuscular decametonio como el bloqueante ganglionar hexametonio inhiben la respuesta a ACh 30 μ M del receptor $\alpha 9$ (Figura 16C, IC₅₀ = 19.9 \pm 2.4 μ M, n=5 y 27.7 \pm 1.8 μ M, n=4, respectivamente).

Estos resultados se agregan a las observaciones previas que reportaban el bloqueo por d-tubocurarina y las toxinas α y κ bungarotoxina¹²⁷. Se observó que otra toxina, la metillicaconitina (MLA), que en el rango nanomolar es un bloqueante selectivo de receptores neuronales sensibles a la α bungarotoxina, bloquea al receptor $\alpha 9$ en forma potente (IC₅₀=1.1 \pm 0.2 nM, n=4, Figura 16A). La presencia de MLA produce un aumento del valor de EC₅₀ de ACh de 16.4 \pm 3.2 a 43.5 \pm 8.9 μ M (n=3, p<0.05) sin cambios significativos ni en la respuesta máxima ni en el coeficiente de Hill (Figura 16B), lo cual estaría indicando un bloqueo de tipo competitivo.

¹²⁷ (Elgoyhen et al., 1994)

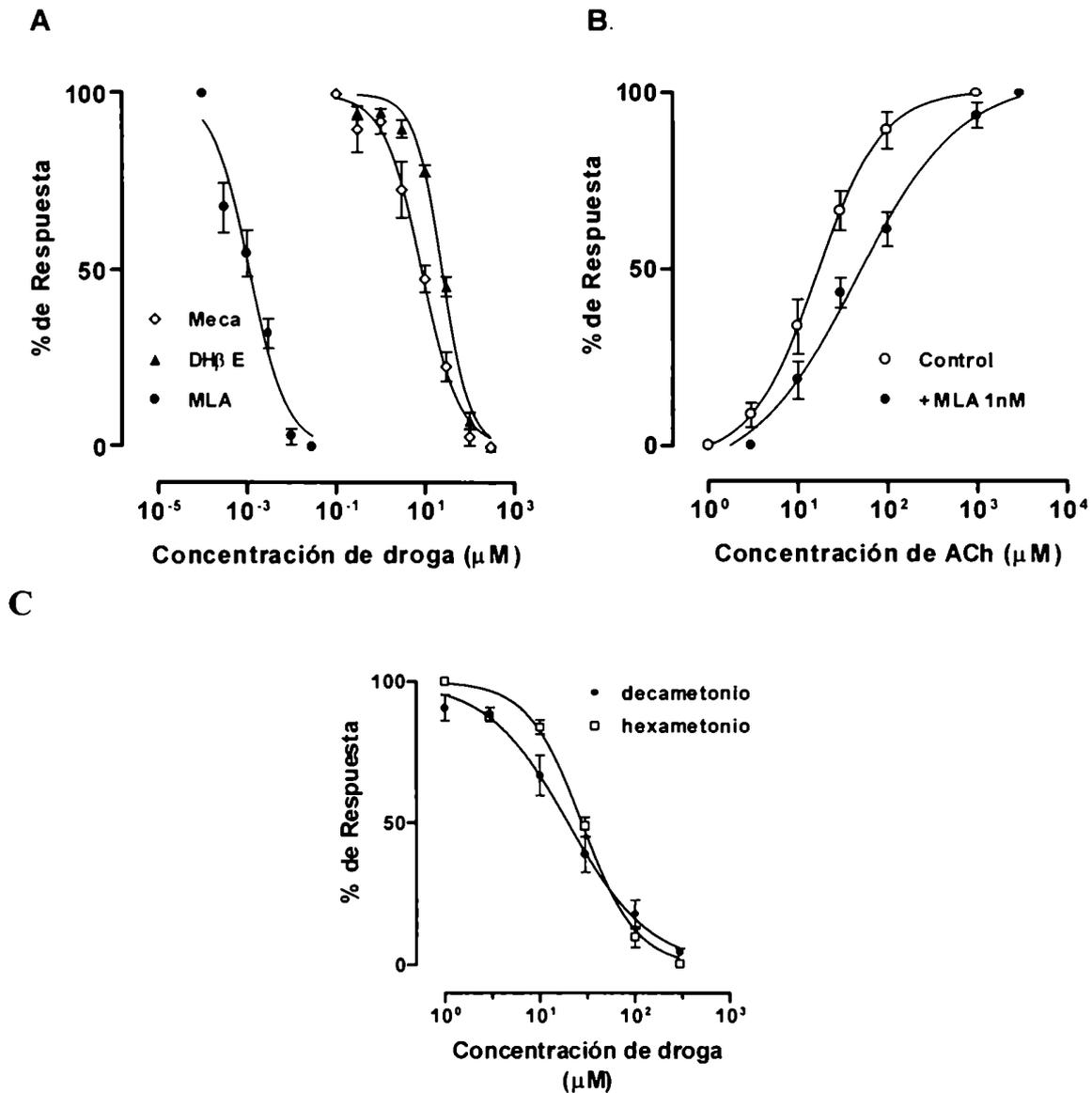


Figura 16 - Bloqueo del receptor $\alpha 9$ por antagonistas nicotínicos

A: Curvas de inhibición realizadas por la aplicación de ACh 10 μM en presencia de concentraciones crecientes de mecamilamina (Meca), dihidro- β -eritroidina (DH β E) y metillicaonitina (MLA). Los valores de picos de corriente fueron normalizados y referidos con respecto al pico de corriente evocada por ACh 10 μM para cada ovocito.

B: Curvas concentración - respuesta a ACh sola (control) o en presencia de MLA 1 nM. Los valores pico de corriente fueron normalizados y referidos a la respuesta máxima a concentración saturante de ACh. Cada punto representa el promedio \pm error estándar ($n = 3$ a 5).

C: Curvas de inhibición realizadas por la aplicación de ACh 30 μM en presencia de concentraciones crecientes de decametonio y hexametonio. Los valores de picos de corriente fueron normalizados y referidos con respecto al pico de corriente evocada por ACh 30 μM para cada ovocito.

4.1.4]

Compuestos muscarínicos clásicos bloquean la respuesta del receptor $\alpha 9$ a ACh

El reporte previo¹²⁸ de la acción inhibitoria sobre el receptor $\alpha 9$ de drogas prototípicamente muscarínicas como el agonista oxotremorina-M y el antagonista atropina, así como el efecto agonista parcial de ciertas drogas muscarínicas, indican una interacción atípica entre drogas muscarínicas y un receptor que por su naturaleza molecular debería ser clasificado dentro del grupo de receptores nicotínicos. Con el objeto de profundizar este estudio farmacológico y descartar que los efectos antecitados no sean sólo una respuesta peculiar del receptor $\alpha 9$ a esas drogas, sino la manifestación de una característica distintiva de este receptor, se ensayó la acción de otra serie de compuestos muscarínicos, algunos de ellos con mayor selectividad por ciertos subtipos. Los agonistas muscarínicos inespecíficos muscarina, pilocarpina y betanecol no tuvieron efecto *per se* sobre ovocitos inyectados con ARNc $\alpha 9$, sin embargo estas drogas inhibieron total y reversiblemente las corrientes inducidas por ACh en forma dependiente de la concentración (Figuras 17 y 18A). El mismo tipo de efecto se observó en el caso de la galamina, un antagonista con selectividad por el subtipo M2. A pesar del hecho de que el agonista McN-a-343, más potente sobre el subtipo M1, es capaz de activar al receptor $\alpha 9$, se comprobó que la pirenzepina, un antagonista específico M1, no posee efectos agonistas o antagonistas sobre este receptor, a concentraciones tan altas como 100 μ M (datos no mostrados).

¹²⁸ (Elgoyhen et al., 1994)

El orden de potencia derivado de curvas de inhibición completas (Figura 18A) para todas las drogas muscarínicas mencionadas resultó ser: atropina ($IC_{50}=1.0\pm 0.1\mu M$, $n=4$) \approx galamina ($IC_{50}=1.5\pm 0.2\mu M$, $n=3$) $>$ pilocarpina ($IC_{50}=76\pm 9\mu M$, $n=4$) \approx muscarina ($IC_{50}=84\pm 6\mu M$, $n=4$) \approx betanecol ($IC_{50}=105\pm 14\mu M$, $n=3$).

Por otra parte se realizaron curvas de concentración - respuesta a ACh en ausencia y presencia de atropina con el fin de investigar el mecanismo de la interacción (Figura 18B). El desplazamiento paralelo de la curva junto con una disminución en la potencia del agonista (en ausencia de atropina: $EC_{50} = 11.9\pm 0.6\mu M$, $n_{Hill} = 1.2\pm 0.1$; en presencia de atropina $1\mu M$: $EC_{50} = 41.1\pm 5.4\mu M$, $n_{Hill} = 1.2\pm 0.3$; en presencia de atropina $10\mu M$: $EC_{50} = 143\pm 49\mu M$, $n_{Hill} = 1.3\pm 0.2$) son compatibles con un mecanismo competitivo en el que los sitios de unión a ACh se superponen parcial o totalmente con los del antagonista muscarínico.

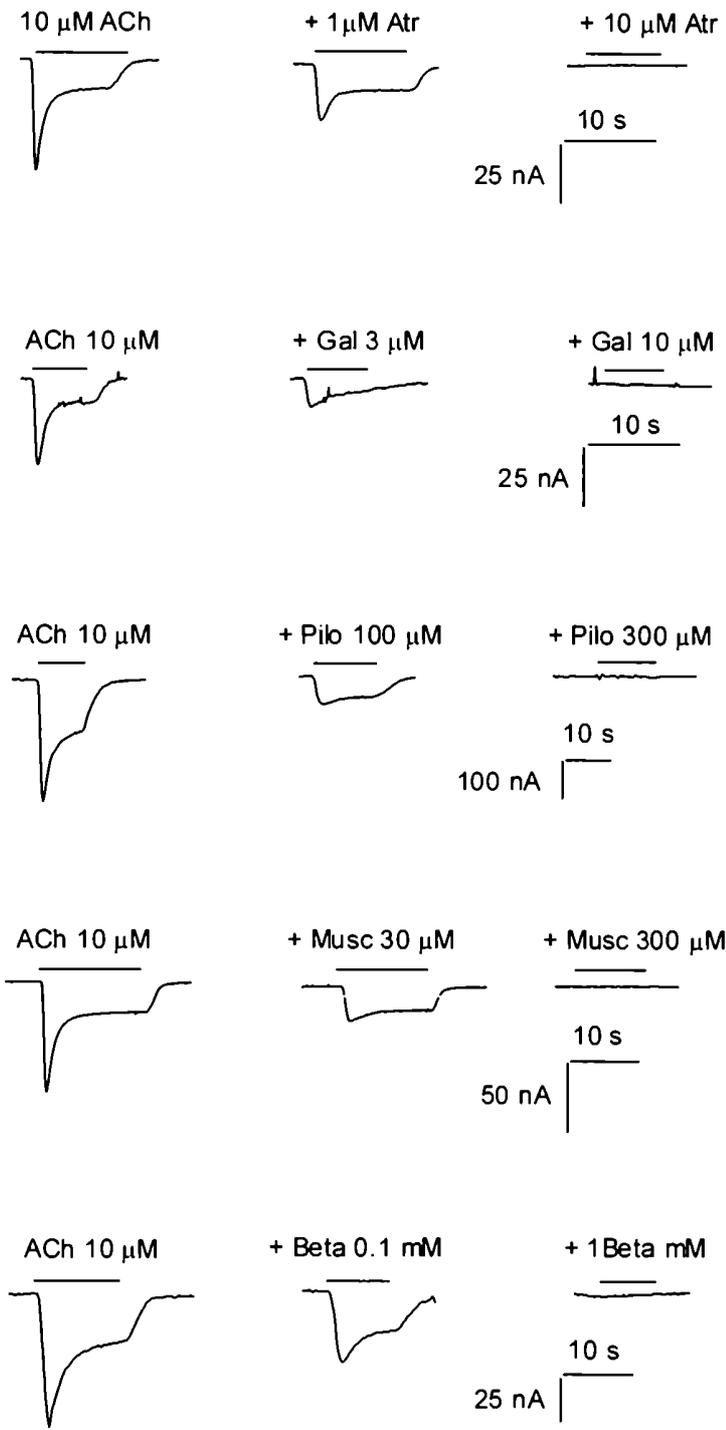


Figura 17 - Bloqueo del receptor $\alpha 9$ por drogas muscarínicas

Trazos representativos de corrientes evocadas por ACh 10 μM sola o en presencia de atropina (Atr), galamina (Gal), pilocarpina (Pilo), muscarina (Musc) o betanecol (Beta).

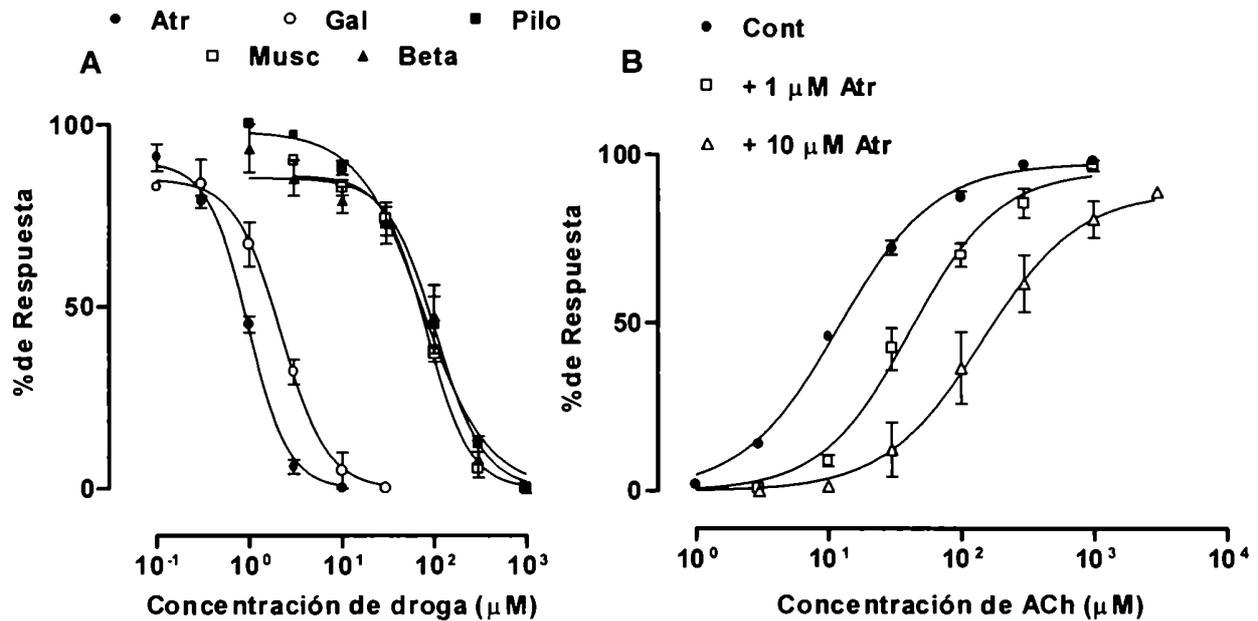


Figura 18 - Bloqueo del receptor $\alpha 9$ por compuestos muscarínicos: curvas de inhibición y desplazamiento

A- Curvas de inhibición realizadas por coaplicación de ACh 10 μM y concentraciones crecientes de atropina (Atr), galamina (Gal), pilocarpina (Pilo), muscarina (Musc) y betanecol (Beta). Los valores de picos de corriente fueron normalizados y referidos con respecto al pico de corriente evocada por ACh 10 μM para cada ovocito.

B: Curvas concentración - respuesta a ACh sola (Cont) o en presencia atropina (Atr) 1 y 10 μM . Los valores pico de corriente fueron normalizados y referidos a la respuesta máxima para cada ovocito a concentración saturante de ACh. Cada punto representa el promedio \pm error estándar ($n = 4$ a 13).

4.2]

Modulación opioide de los receptores $\alpha 9$ y $\alpha 9\alpha 10$

Ha sido demostrada la colocalización de ACh y péptidos opioides en las neuronas eferentes de la cóclea y lo mismo ha sido propuesto para la innervación eferente vestibular¹²⁹.

Lioudyno y Guth¹³⁰, utilizando la técnica de fijación de voltaje en parches de membrana perforados (*perforated patch patch-clamp*) en células ciliadas vestibulares aisladas del sáculo del oído interno de *Rana pipiens* demostraron la inhibición, reversible y dependiente de la concentración, de las corrientes colinérgicas en presencia tanto del agonista opiáceo inespecífico morfina como de los péptidos opioides endógenos endomorfina-1 y dinorfina B, (IC_{50} : 5.3 μ M, 14.2 μ M y 0.7 μ M, respectivamente¹³¹). Estas corrientes colinérgicas son mediadas por un receptor que contiene a la subunidad $\alpha 9$ y muy probablemente también a la subunidad $\alpha 10$. La presencia del antagonista inespecífico opioide naloxona no antagoniza la inhibición de las corrientes colinérgicas por morfina y solo parcialmente la de los péptidos opioides; mientras que el efecto de endomorfina-1 es insensible al antagonista opioide inespecífico diprenorfina o al CTOP¹³², un antagonista específico de receptores opioides μ . Estos resultados estarían indicando que al menos parte de la acción de los opioides sería mediada directamente por el receptor colinérgico de las células ciliadas vestibulares.

¹²⁹ (Altschuler et al., 1988; Fex and Altschuler, 1981; Guth et al., 1998; Ryan et al., 1991)

¹³⁰ (Lioudyno et al., 2000)

¹³¹ (Lioudyno et al., 2001; Lioudyno et al., 2000)

¹³² H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂ (Gulya et al., 1988; Gulya et al., 1986)

Con el objeto de aportar una evidencia más directa en apoyo de esta hipótesis, se estudió la acción de la morfina y la naloxona sobre el receptor recombinante $\alpha 9$ en el sistema de expresión heterólogo de ovocitos de *Xenopus laevis*, el cual carece de receptores opioides endógenos. Se comprobó que tanto la morfina como la naloxona son capaces de inhibir en forma reversible y dependiente de la concentración la respuesta del receptor $\alpha 9$ a la ACh, con IC_{50} de $20 \pm 1 \mu M$ ($n=5$) y $33 \pm 2 \mu M$ ($n=4$) respectivamente (Figura 19). La inhibición producida por morfina $10 \mu M$ se revierte a concentraciones saturantes de ACh. En presencia de esa concentración del opiáceo, se verificó un desplazamiento paralelo de la curva concentración - respuesta a ACh con un aumento de EC_{50} para la ACh de $10 \pm 1 \mu M$ a 32 ± 5 ($n=3$, $p<0.05$), lo cual sugiere un mecanismo de tipo competitivo (Figura 20).

En el mismo sistema de expresión se estudió el efecto de la endorfina-1 y la dinorfina B sobre el receptor recombinante heteromérico $\alpha 9:\alpha 10$ (Figura 21). Se comprobó que concentraciones en el rango micromolar de ambos péptidos opioides inhiben reversiblemente la respuestas a ACh del receptor $\alpha 9:\alpha 10$ con IC_{50} de $1.6 \pm 0.2 \mu M$ ($n=3$) para dinorfina B y $1.6 \pm 0.3 \mu M$ ($n=4$) para endomorfina 1.

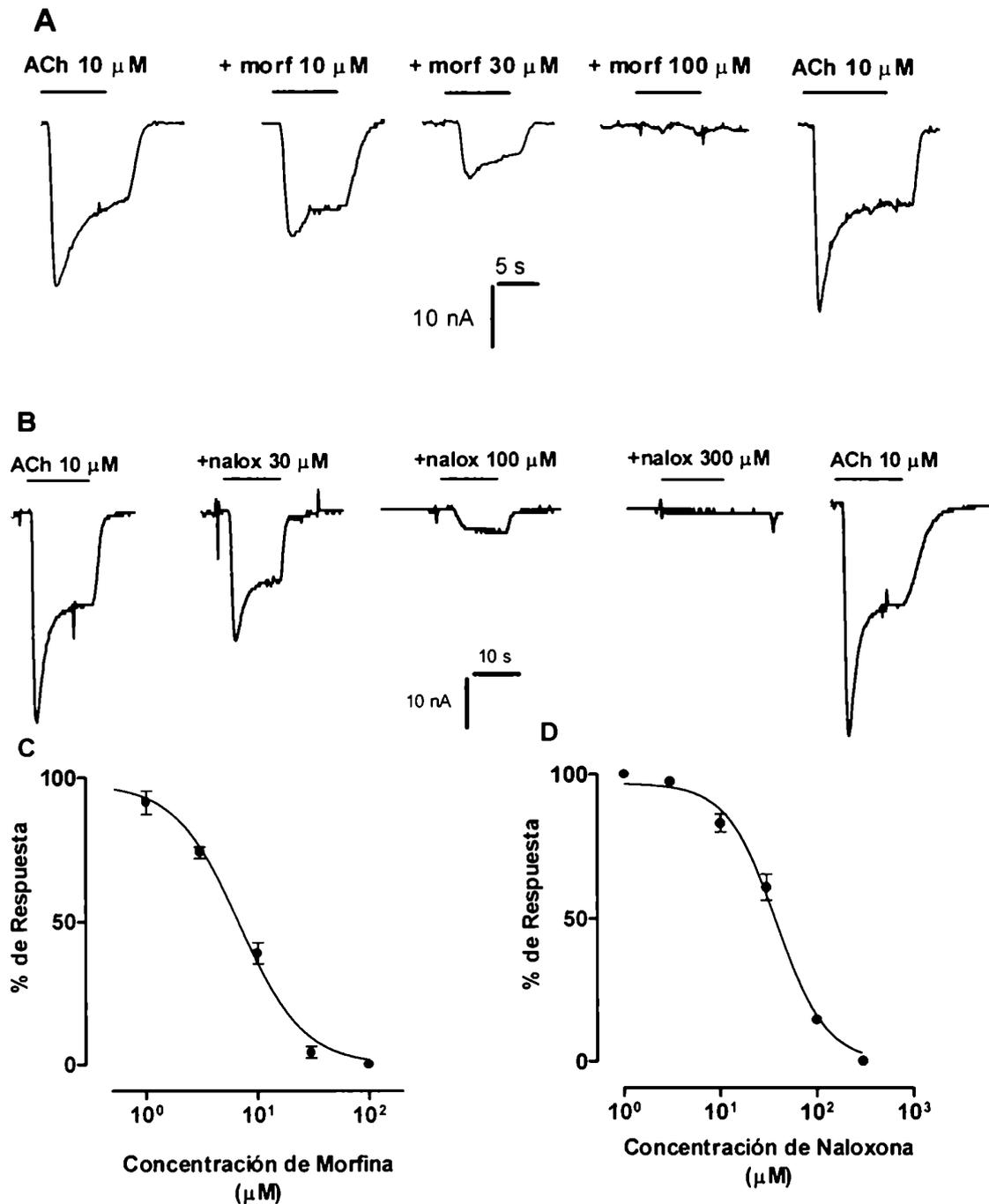


Figura 19 - Bloqueo del receptor $\alpha 9$ por morfina y naloxona

A-B: Trazos representativos de corrientes evocadas por ACh 10 μ M sola o en presencia de concentraciones crecientes de morfina (A, morf) o naloxona (B, nalox).

C-D: Curvas de inhibición realizadas por aplicación de ACh 10 μ M en presencia de concentraciones crecientes de morfina (C) o naloxona (D). Los valores de picos de corriente fueron normalizados y referidos con respecto al pico de corriente evocada por ACh 10 μ M para cada ovocito. Cada punto representa el promedio \pm error estándar (n = 4 a 5).

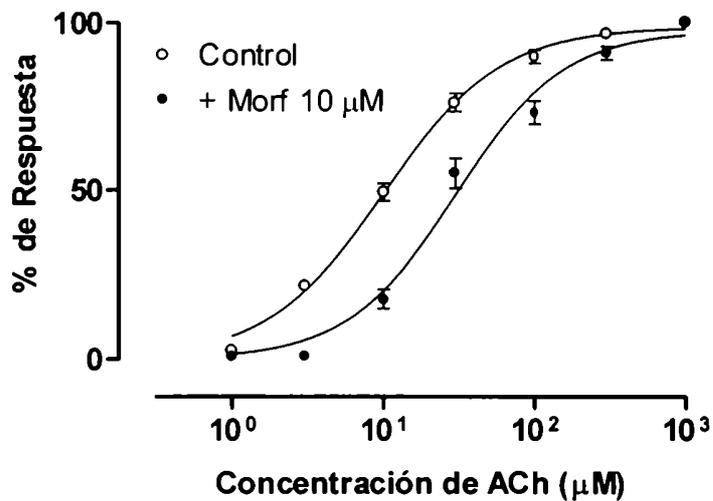


Figura 20 - Desplazamiento de la curva concentración - respuesta a ACh en presencia de morfina

Curvas concentración - respuesta a ACh sola (control) o en presencia de morfina (Morf) 10 μM. Los valores pico de corriente fueron normalizados y referidos a la respuesta máxima a concentración saturante de ACh. Cada punto representa el promedio ± error estándar (n = 3).

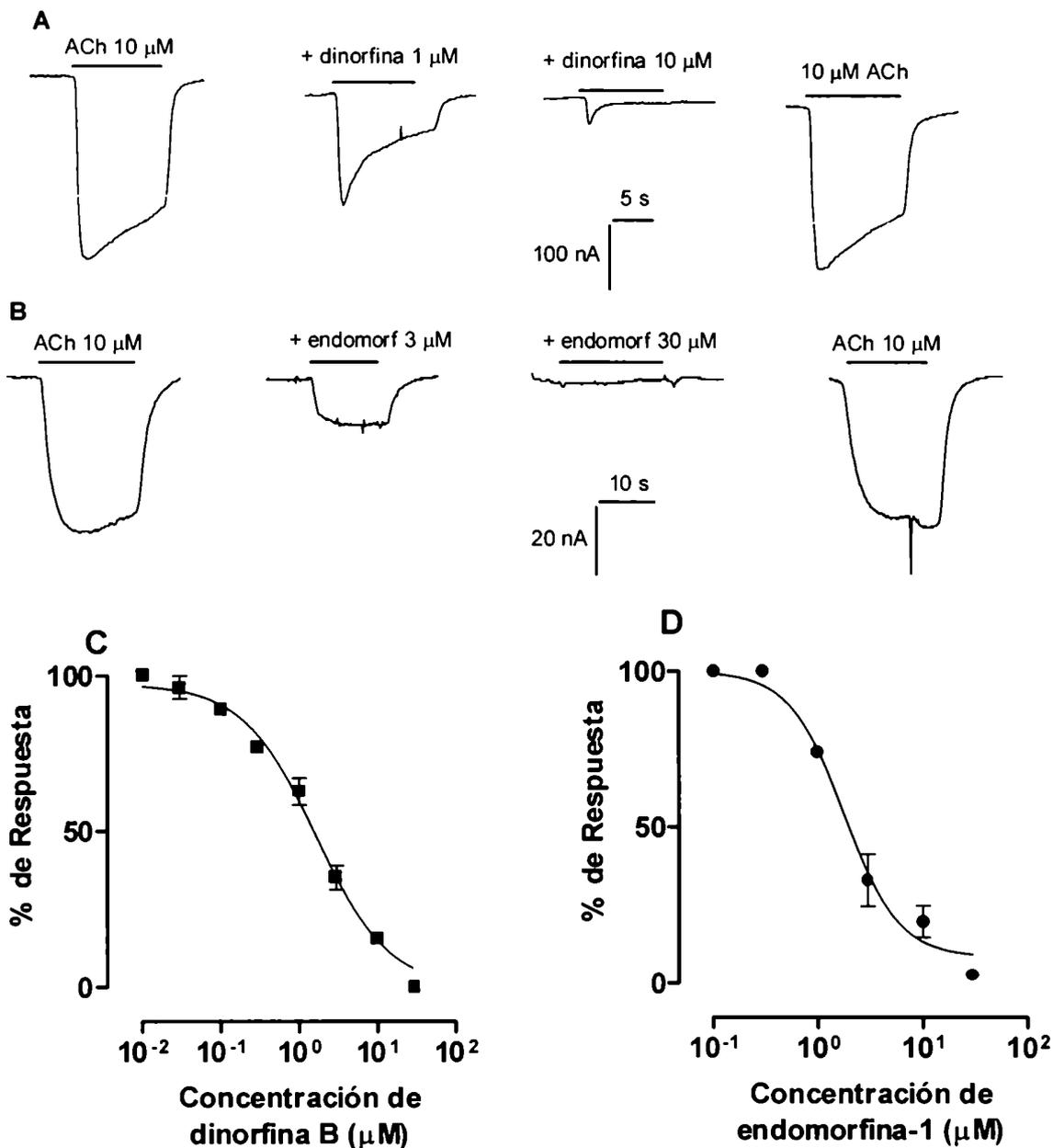


Figura 21- Bloqueo del receptor heteromérico $\alpha 9:\alpha 10$ por opioides

A-B: Trazos representativos de corrientes evocadas por ACh 10 μM sola o en presencia de concentraciones crecientes de dinorfina B (*A*) o endomorfina 1 (*B*, endomorf).

C-D: Curvas de inhibición realizadas por aplicación de ACh 10 μM en presencia de concentraciones crecientes de dinorfina B (*C*) o endomorfina 1 (*D*). Los valores de picos de corriente fueron normalizados y referidos con respecto al pico de corriente evocada por ACh 10 μM para cada ovocito. Cada punto representa el promedio \pm error estándar ($n = 3$ a 4)

4.3]

Papel de los iones Ca^{++} y Mg^{++} en la modulación del receptor $\alpha 9$ y su relación con el potencial de membrana

La liberación de ACh de los terminales eferentes en las sinapsis con las células ciliadas externas resulta en un flujo entrante de Na^+ y Ca^{++} a través de un canal activable por ACh que tiene por componente a la subunidad $\alpha 9$. Dicho ingreso de Ca^{++} , a su vez, induce una corriente saliente de K^+ a través de un canal selectivamente permeable a K^+ y activable por Ca^{++} intracelular¹³³. Esta corriente saliente de K^+ causa una hiperpolarización de las células ciliadas externas, lo que lleva a una reducción en el movimiento de la membrana basilar¹³⁴. Por otra parte se ha reportado que las curvas I-V¹³⁵ de la respuesta colinérgica en células ciliadas externas de cobayo y en las células ciliadas cortas de de pollo (equivalentes a las CCE de mamíferos) muestran una importante rectificación aparentemente causada por un bloqueo debido a cationes divalentes¹³⁶. Por otro lado y en concordancia con lo descrito para el receptor nativo, ha sido demostrado que el receptor recombinante $\alpha 9$ expresado en ovocitos de *Xenopus laevis* es muy permeable a Ca^{++} ($P_{\text{Ca}^{++}}/P_{\text{Na}^+} \approx 9$)¹³⁷, lo que lleva a la activación de canales

¹³³ (Blanchet et al., 1996; Doi and Ohmori, 1993; Erostequi et al., 1994; Evans, 1996; Housley and Ashmore, 1991; Nenov et al., 1996; Oliver et al., 2000)

¹³⁴ (Guinan, 1996)

¹³⁵ Una curva I-V da una medida de la relación entre la intensidad de la corriente y el potencial de membrana, cuando esta relación no es ohmica, es decir no es lineal, se dice que el canal (o la membrana) "rectifica"; una "rectificación saliente" o "de salida" se verifica cuando la magnitud de la corriente positiva es mayor que la de la corriente negativa, a la situación inversa se la llama "rectificación entrante" o "de entrada".

¹³⁶ (Blanchet et al., 1996; Evans, 1996; McNiven et al., 1996)

¹³⁷ (Elgoyhen et al., 1994; Katz et al., 2000)

selectivamente permeables a Cl^- , activados por Ca^{++} intracelular, propios del ovocito¹³⁸.

Dado que el receptor nativo es permeable a Ca^{++} y a su vez regulado por Ca^{++} y Mg^{++} extracelular, se decidió investigar el efecto de variar la concentración extracelular de Ca^{++} sobre las respuestas a ACh en ovocitos inyectados con ARNc $\alpha 9$. Para evitar la interferencia de las corrientes secundarias de Cl^- activadas por Ca^{++} ($\text{ICl}_{(\text{Ca})}$), propias del sistema, se utilizó BAPTA como quelante intracelular de Ca^{++} . Se registraron respuestas producidas por ACh en ovocitos inyectados con ARNc $\alpha 9$ a distintos potenciales de membrana y a diferentes concentraciones extracelulares de Ca^{++} (Figura 23). A -70mV , un potencial de membrana similar al de reposo de las CCE¹³⁹, el IC_{50} para el bloqueo por Ca^{++} fue de $100 \pm 10 \mu\text{M}$ ($n=3$, Figura 22). Se observa que a potenciales hiperpolarizantes la magnitud de la corriente disminuye a medida que se aumenta la concentración extracelular de Ca^{++} .

Para una mejor caracterización de este bloqueo por Ca^{++} del receptor $\alpha 9$ se realizaron curvas I-V mediante la aplicación de rampas de potencial (desde $+40$ a -120mV , partiendo de un potencial de sostén de -70mV) durante la aplicación de ACh $10 \mu\text{M}$, en presencia de distintas concentraciones extracelulares de Ca^{++} (Figura 24). A 1.8mM de Ca^{++} se observa una importante rectificación de salida con una forma compleja de la curva I-V en la región de corriente entrante. A medida que se disminuye la concentración de Ca^{++} la rectificación se hace menos pronunciada, a la vez que la magnitud de la corriente aumenta en todo el rango de voltaje de la medición. Las curvas I-V permiten ver claramente la dependencia del voltaje de este

¹³⁸ (Barish, 1983; Boton et al., 1989; Miledi and Parker, 1984)

¹³⁹(Dallos et al., 1982)

bloqueo por Ca^{++} , más pronunciado a potenciales más negativos. Recíprocamente permiten afirmar que la falta de linealidad de las curvas I-V del receptor $\alpha 9$ es debida mayormente a un bloqueo del canal por los iones Ca^{++} , aunque otros factores puedan estar incidiendo, entre ellos un posible efecto alostérico modulador del Ca^{++} debido a su interacción con sitios de unión extracelulares en el receptor¹⁴⁰. Con el objeto de cuantificar el efecto del Ca^{++} sobre la rectificación de la corriente, se calculó el cociente de la amplitud de la corriente a +40 mV con respecto al valor a -90 mV, siendo este cociente de 3.1 ± 0.5 en Ca^{++} 1.8 mM y 1.1 ± 0.2 en Ca^{++} 0.1 mM (n=7, p<0.05).

Al sustituir el Ca^{++} extracelular por distintas concentraciones de Mg^{++} se observa también el bloqueo de la corriente (Figura 25).

¹⁴⁰ Como ha sido descrito para otros receptores nicotínicos (Galzi et al., 1996)

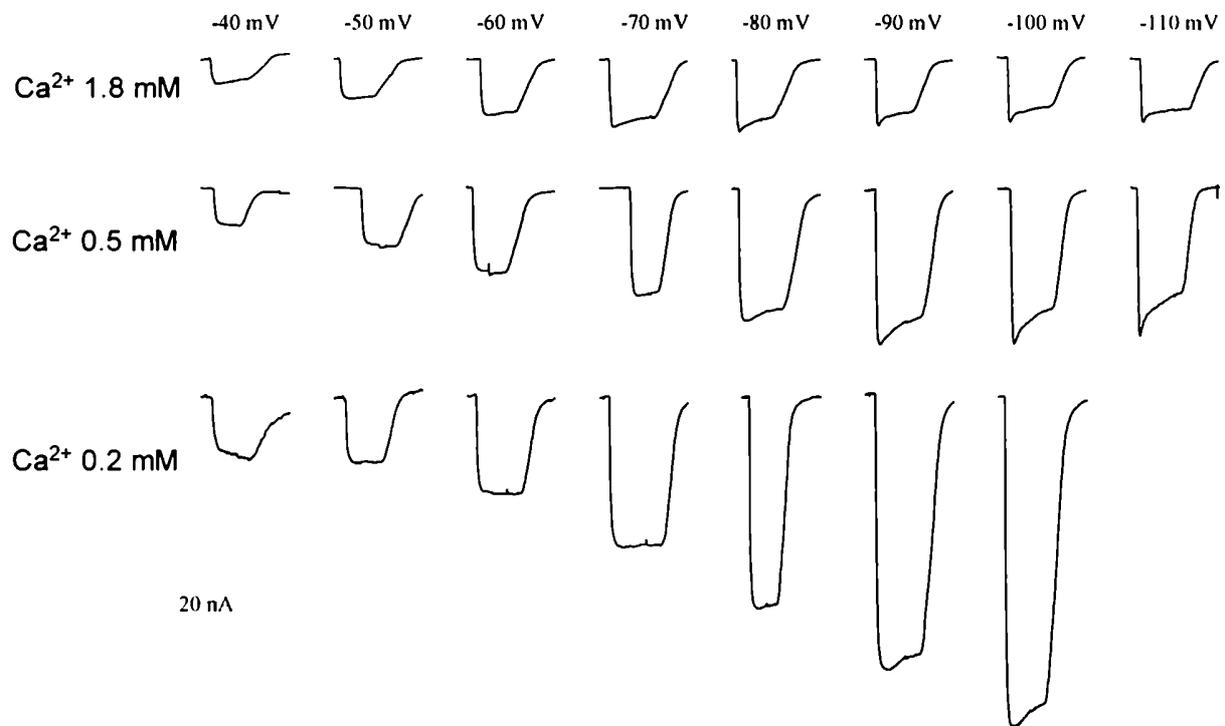


Figura 22 - Efecto de la concentración de Ca^{++} extracelular sobre la magnitud de la respuesta a ACh del receptor $\alpha 9$

Registros representativos de corrientes evocadas por ACh $100 \mu\text{M}$ sobre un ovocito inyectado con ARNc $\alpha 9$. El ovocito fue incubado antes del experimento con BAPTA/AM $100 \mu\text{M}$ durante 3 h. Cada fila corresponde a una concentración de Ca^{++} y cada columna a un potencial de membrana distintos ($n = 3$). Las respuestas ilustradas corresponden a un mismo ovocito.

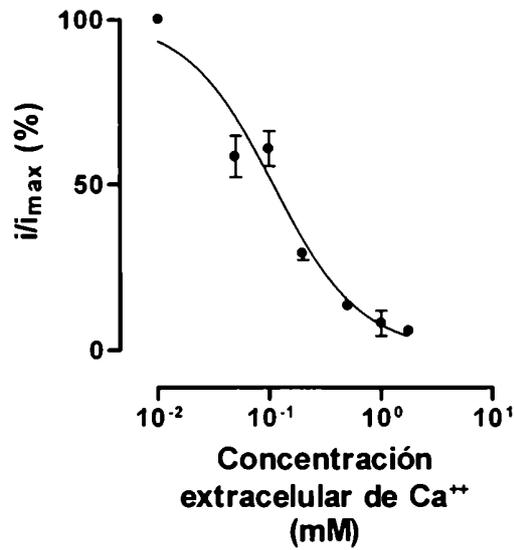


Figura 23 - Dependencia de la concentración del bloqueo por Ca^{++} del receptor $\alpha 9$

Inhibición de las respuestas a ACh 100 μ M en función de la concentración extracelular de Ca^{++} ($V_{sostén} = -70$ mV). Las amplitudes de respuestas como las mostradas en la cuarta columna de la Figura 21 fueron normalizadas y referidas con respecto a la corriente máxima ($i_{máx}$) obtenida a Ca^{++} 0.01 mM. Los valores graficados representan el promedio \pm error estándar de $n = 3$ ovocitos

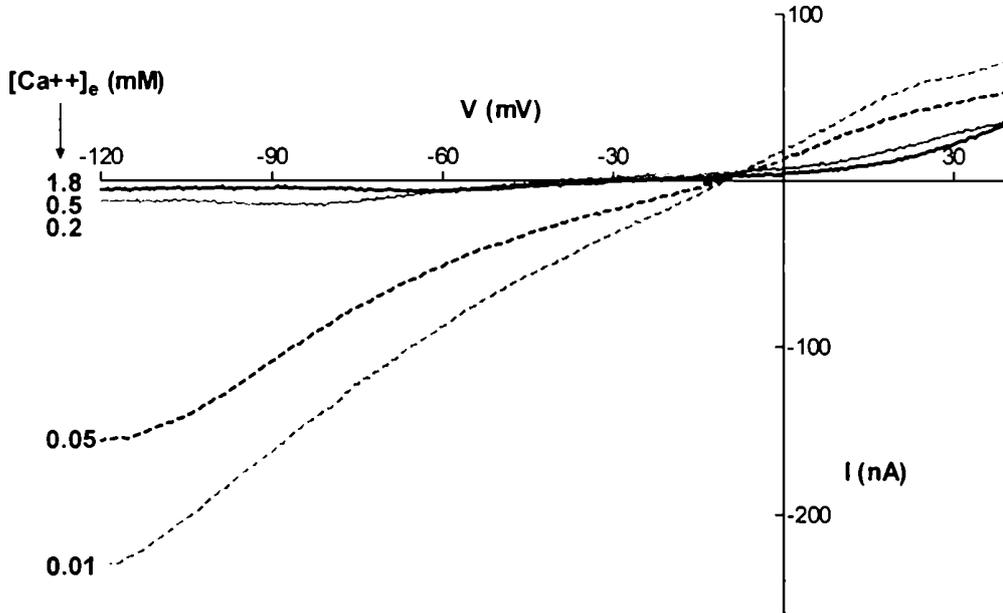


Figura 24- Efecto del Ca^{++} extracelular sobre la relación corriente - potencial del receptor $\alpha 9$

Trazos representativos de curvas I-V a distintas concentraciones de Ca^{++} extracelular generadas por aplicación de una rampa de voltaje (-120 a +40 mV, 2seg, $V_{\text{sostén}} = -70$ mV) durante la aplicación de ACh 100 μM sobre un ovocito inyectado con ARNc $\alpha 9$ y preincubado con BAPTA-AM por 3 hs previo al registro. (n = 7). Las curvas ilustradas corresponden a un mismo ovocito.

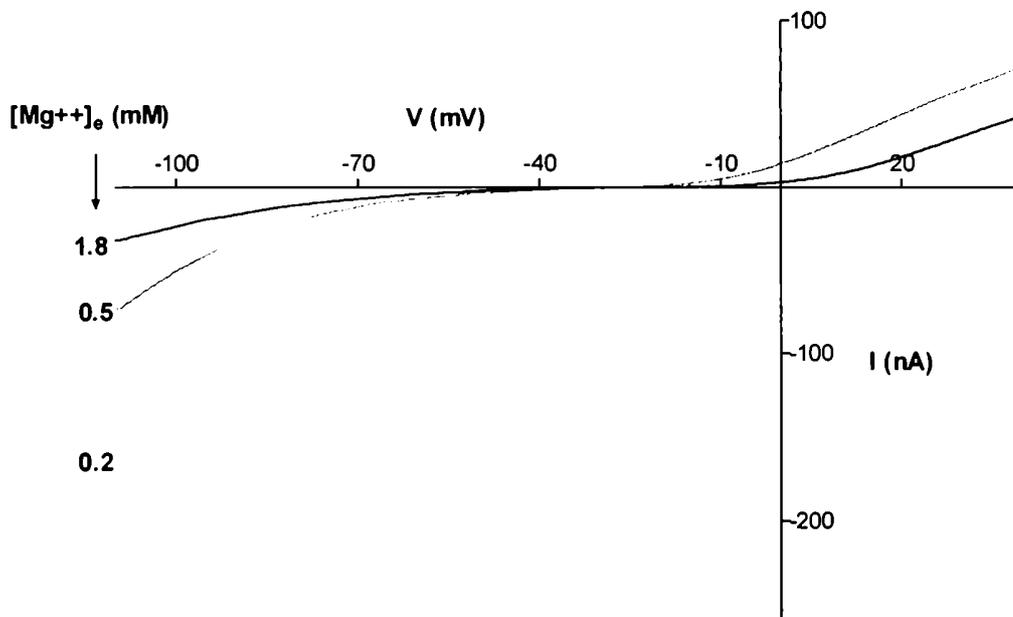


Figura 25 - Efecto del Mg^{++} extracelular sobre la relación corriente - potencial del receptor $\alpha 9$

Trazos representativos de curvas I-V a distintas concentraciones de Mg^{++} extracelular generadas por aplicación de una rampa de voltaje (+40 a -120 mV, 2 seg, $V_{sostén} = -70$ mVs) durante la aplicación de ACh 100 μ M sobre ovocitos inyectado con ARNc $\alpha 9$ (n = 3). Las curvas ilustradas corresponden a un mismo ovocito.

4.4]

Relación estructura - función del receptor homomérico $\alpha 9$ y el receptor $\alpha 9:\alpha 10$

4.4.1]

El receptor $\alpha 9$ compartiría características estructurales con otros receptores de la familia de canales activados por ligando con asa de cisteína y su porción aminoterminal funciona como un dominio autónomo responsable de la interacción con la ACh.

Hasta el momento no se conoce la estructura de ningún canal iónico activado por ligando a un nivel de resolución tal que permita una apreciación completa de las interacciones moleculares entre el ligando y el receptor, y de como esta interacción se traduce en cambios en el estado del canal¹⁴¹. Una estrategia experimental que permite investigar la estructura proteica es la de crear quimeras entre diferentes miembros de una familia en particular. A diferencia de las maneras más convencionales de mapear los dominios funcionales de las proteínas (tales como la susceptibilidad a la proteólisis o la mutagénesis de eliminación de fragmentos, las cuales a menudo dañan o destruyen la función de interés), la producción de proteínas quiméricas usualmente permite la transferencia de una función de una proteína a otra¹⁴². Ha sido especialmente difícil crear quimeras funcionales de proteínas de membrana tales como receptores y canales iónicos. Eiselé et al.¹⁴³ crearon una quimera funcional entre las subunidades de dos canales homoméricos activados por ligando diferentes: el receptor nicotínico $\alpha 7$ y el receptor de

¹⁴¹ (Hucho et al., 1996; Unwin, 1998)

¹⁴² (Bochet et al., 1991; Eisele et al., 1993; Wheeler et al., 1993)

¹⁴³ (Eisele et al., 1993)

serotonina de tipo 3A (5HT_{3A}). Pudieron demostrar que las dos porciones empalmadas juegan cada una un papel distinto en el funcionamiento del complejo receptor - canal. Dichos autores muestran que la proteína quimérica formada por el dominio aminoterminal de la subunidad $\alpha 7$ y los supuestos dominios transmembranales de la subunidad del receptor 5HT_{3A}, forma un receptor que tiene las características farmacológicas de la primera y las propiedades de canal de la última.

De estos resultados puede inferirse el principio de que los distintos dominios de estas proteínas pueden funcionar como unidades relativamente autónomas. Con el objetivo de poner a prueba la generalidad de este principio y de obtener información experimental sobre la relación estructura - función del receptor $\alpha 9$ que apoye o corrija las suposiciones hechas sobre la topología del receptor $\alpha 9$ y las funciones de sus distintos dominios principales¹⁴⁴, se generó una proteína quimérica entre el receptor $\alpha 9$ y el 5HT_{3A}. Por otra parte, la quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A} construida por Eiselé et al. posee un muy buen nivel de expresión en ovocitos de *Xenopus* y en otros sistemas heterólogos, por lo que ha sido utilizada en lugar de la subunidad $\alpha 7$ en diversos estudios¹⁴⁵. Esto llevó a concebir la construcción de la quimera entre $\alpha 9$ y 5HT_{3A}, no sólo como un medio para el estudio de las relaciones estructura - función, sino también, cómo una posible estrategia experimental para superar las dificultades técnicas debidas a la pequeña amplitud de las corrientes obtenidas con el receptor $\alpha 9$ expresado en ovocitos y a la falta de éxito en su expresión en otros sistemas heterólogos.

¹⁴⁴ Las subunidades de canales catiónicos homoméricos activados por ligando 5HT_{3A} y $\alpha 9$ poseen secuencias aminoacídicas a partir de las cuales, se puede predecir en base a perfiles de hidrofobicidad, una estructura análoga con cuatro segmentos transmembrana, un lazo citoplasmático y dos segmentos terminales extracelulares. La similitud entre ambas proteínas es un requisito para el éxito de esta estrategia experimental, pues la misma se basa en la presunción de que proteínas homólogas adoptan conformaciones tridimensionales semejantes.

¹⁴⁵ (Corringer et al., 1995; Eisele et al., 1993; Galzi et al., 1996)

Para la obtención de la quimera entre $\alpha 9$ y $5HT_{3A}$ se construyó un ADNc quimérico a partir de los correspondientes a la porción aminoterminal de la subunidad $\alpha 9$, hasta el comienzo del primer segmento transmembranal y a la porción que se extiende desde ese punto (posición 209, numeración $\alpha 9$) hasta el extremo carboxiterminal de la subunidad del receptor $5HT_{3A}$ (Figura 26). Mediante la transcripción in vitro de este ADNc y subsecuente inyección del ARNc resultante en ovocitos de *Xenopus laevis* se obtuvo la expresión de un receptor homomérico activable por ACh (Figura 27) e incapaz de responder a la serotonina (datos no mostrados). Este resultado demuestra la previsión de que el sitio de unión de ACh se encuentra en la región aminoterminal del receptor $\alpha 9$ y reproduce la observación de Eisele et al. de que sin la porción aminoterminal del receptor $5HT_{3A}$ no es posible la activación por serotonina de un canal que, por todo lo demás, es completamente funcional¹⁴⁶. La respuesta del receptor quimérico $\alpha 9(209)5HT_{3A}$ a ACh es dependiente de la concentración ($EC_{50} = 70 \pm 6 \mu M$, $n_{Hill} = 1.2 \pm 0.1$, $n = 5$). Las corrientes observadas en respuesta a ACh $100 \mu M$ variaron en amplitud entre 11 y 49 nA ($n=21$), lo que frustró las expectativas de utilizar este receptor quimérico como alternativa a $\alpha 9$ para estudios farmacológicos y de mutagénesis.

Las respuestas del receptor $\alpha 9(209)5HT_{3A}$ a ACh $100 \mu M$ son inhibidas por la MLA, el antagonista más potente conocido para el receptor $\alpha 9$, con IC_{50} de 9 ± 1 nM, (Figura 28). Este compuesto no tiene efecto sobre el receptor $5HT_{3A}$ (datos no mostrados). También la atropina, la nicotina y la estricnina bloquean el receptor quimérico (datos no mostrados).

¹⁴⁶ (Eisele et al., 1993)

Por otra parte, la amplitud de la corriente generada por la ACh al activar el receptor quimérico $\alpha 9(209)5HT_{3A}$ varía en forma casi lineal con el potencial de membrana (Figura 29), a diferencia de lo observado para la relación corriente - potencial del receptor $\alpha 9$, y en concordancia con el receptor $5HT_{3A}$, como ya fue reportado para el receptor $5HT_{3A}$ y para el receptor quimérico $\alpha 7-5HT_{3A}$ ¹⁴⁷. Estos resultados sugieren que el dominio aminoterminal de la subunidad $\alpha 9$ actuaría como un módulo funcional autónomo responsable de la interacción con agonistas como la ACh y antagonistas como la MLA.

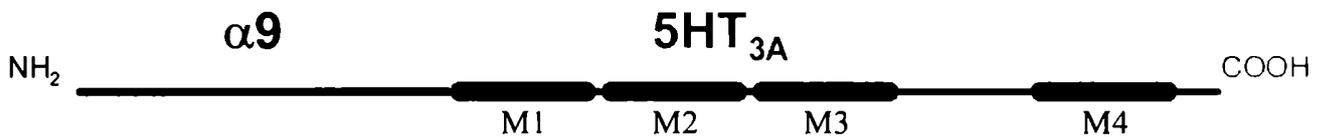


Figura 26- La subunidad quimérica $\alpha 9(209)5HT_{3A}$

Para obtener la subunidad quimérica $\alpha 9(209)5HT_{3A}$ cuya estructura primaria se ilustra en el esquema, se construyó mediante una serie de PCRs (ver métodos) un ADNc. Este comprende la secuencia codificante de la subunidad $\alpha 9$ (trazo negro) desde el extremo aminoterminal hasta el comienzo del segmento M1 y la secuencia de la subunidad $5HT_{3A}$ (trazo gris) desde ese punto hasta su extremo carboxiterminal, incluyendo los cuatro segmentos hidrófobos (trazo grueso).

¹⁴⁷ (Eisele et al., 1993)

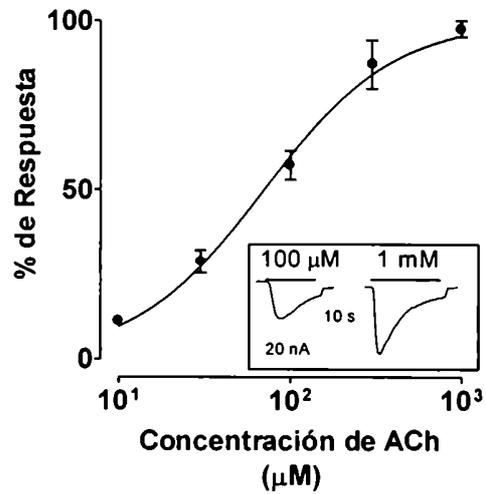


Figura 27 - Activación por la ACh del receptor homomérico $\alpha 9(209)5HT_{3A}$

Curva concentración - respuesta a ACh de ovocitos inyectados con ARNc $\alpha 9(209)5HT_{3A}$. La amplitud pico de las corrientes fue normalizada y referida a la respuesta máxima a concentración saturante de ACh. Cada punto representa el promedio \pm error estándar (n = 3). En el inserto se muestran trazos representativos de la respuesta a ACh 100 μ M y 1 mM.

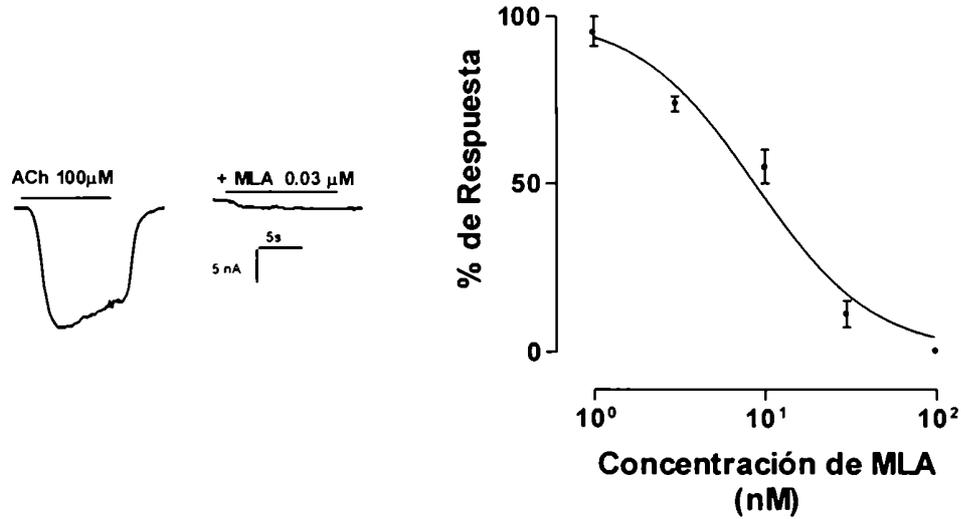


Figura 28 - Bloqueo del receptor $\alpha 9(209)5HT_{3A}$ por MLA

Derecha: Trazos representativos de la respuesta del receptor homomérico quimérico $\alpha 9(209)5HT_{3A}$ a ACh 100 μM sola o en presencia de metillicaonitina (MLA) 0.03 μM .
Izquierda: Curva de inhibición realizada por la aplicación de ACh 100 μM en presencia de concentraciones crecientes de metillicaonitina (MLA). Los valores de picos de corriente fueron normalizados y referidos con respecto al pico de corriente evocada por ACh 100 μM para cada ovocito (n=3).

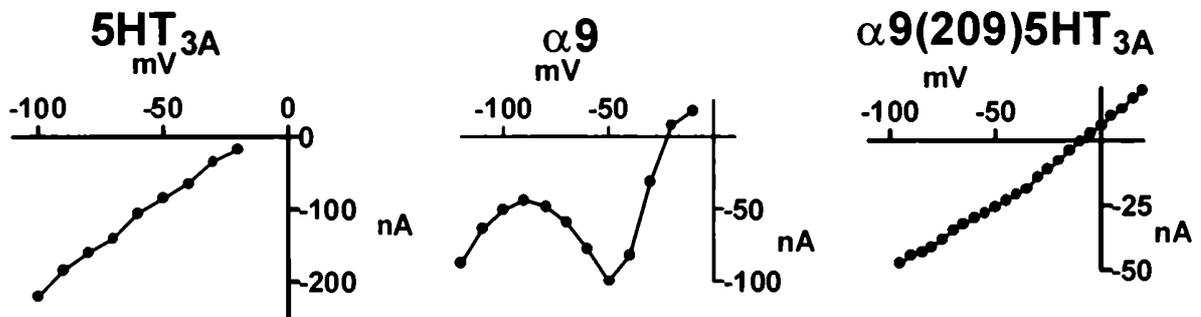


Figura 29 - Relación corriente potencial del receptor $\alpha 9(209)5HT_{3A}$

Curvas I-V del receptor $\alpha 9$ (izquierda) y del receptor $\alpha 9(209)5HT_{3A}$ (derecha). Cada punto representa el pico de amplitud de corriente evocada por ACh (10 μM para $\alpha 9$ y 100 μM para $\alpha 9(209)5HT_{3A}$) a distintos potenciales de sostén. (n=3)

4.4.2]

El segundo segmento transmembranal es un importante determinante estructural de la particular relación corriente - potencial del receptor homomérico $\alpha 9$

Como ya fue mencionado, entre las propiedades del receptor $\alpha 9$, se observa una marcada rectificación saliente, e inclusive una región de pendiente negativa en la curva I-V a potenciales menores a -50 mV (más pronunciada en ausencia de BAPTA intracelular, *Recuadro* en Figura 31). Esta rectificación puede ser interpretada, al menos en parte, en base a los experimentos descritos más arriba (Figura 24) y a los reportados por Katz¹⁴⁸, como un bloqueo del canal por cationes divalentes.

Existen numerosas evidencias provenientes de experimentos de biología molecular, electrofisiología y bioquímica que avalan, la ampliamente aceptada hipótesis, de que el segundo segmento transmembranal (M2) de las subunidades de receptores de ACh nicotínicos (predicho por el perfil de hidrofobicidad), es el principal constituyente estructural de las paredes del poro del canal¹⁴⁹.

Con el fin de identificar determinantes estructurales responsables de la rectificación observada con el receptor $\alpha 9$ y teniendo como hipótesis que existirían uno o más sitios de unión de iones divalentes en el poro del canal, involucrados tanto en la permeabilidad a estos iones, como en el bloqueo por los mismos, y que estos sitios involucrarían a residuos del M2, se utilizó nuevamente la estrategia experimental de intercambio de dominios homólogos. Se generaron subunidades quiméricas entre las subunidades de

¹⁴⁸ (Katz et al., 2000)

¹⁴⁹ (Akabas et al., 1994; Dani, 1989; Giraudat et al., 1986; Giraudat et al., 1987; Giraudat et al., 1989; Leonard et al., 1988)

receptores nicotínicos $\alpha 7$ y $\alpha 9$. La primera de estas quimeras combina la región que se extiende desde el extremo aminoterminal de la subunidad $\alpha 9$ hasta el comienzo del M2 y la subunidad $\alpha 7$ desde ese punto hasta su extremo carboxiterminal (Figura 30). El receptor homomérico $\alpha 7$ es permeable a Ca^{++} , pero a diferencia de lo observado en el caso del receptor $\alpha 9$, no es bloqueado por cationes divalentes.

La expresión del receptor quimérico en ovocitos de *Xenopus laevis* resulta en un receptor funcional que puede ser activado por ACh, sin embargo las corrientes obtenidas presentaron amplitudes muy pequeñas, cercanas al límite de resolución del sistema de registro utilizado (1-3 nA). En tres ovocitos que expresaron el receptor quimérico se obtuvieron corrientes colinérgicas de una amplitud tal que permitieron realizar curvas I-V (Figura 31). Estas curvas muestran que la relación corriente - potencial del receptor quimérico $\alpha 7(244)\alpha 9$ presenta el mismo tipo de rectificación con pendiente negativa observada con $\alpha 9$ (Recuadro en Figura 31). Estos resultados indicarían que la región entre el extremo aminoterminal y el comienzo del M2 (provenientes de $\alpha 7$ en la quimera) no determinaría la particular forma de la curva I-V del receptor $\alpha 9$ y son, en cambio, compatibles con la hipótesis de que el segmento M2 de la subunidad $\alpha 9$ tapizaría el poro del canal y que sería este dominio el que confiere las mencionadas características al canal. Debido a la pequeña amplitud de las corrientes obtenidas, no fue posible registrar corrientes generadas por el canal $\alpha 7(244)\alpha 9$ en ovocitos preincubados con BAPTA-AM (datos no mostrados), lo cual impidió eliminar la incertidumbre en la interpretación de los resultados, debida a la posible presencia de la corriente de Cl^- que se activaría en el caso que el receptor quimérico permitiera el ingreso de Ca^{++} .

También se construyeron la quimera inversa $\alpha 9(244)\alpha 7$ y la quimera $\alpha 7$ - $\alpha 9M2-\alpha 7$, esta última sólo contiene el segmento M2 de la subunidad $\alpha 9$, proviniendo el resto de su secuencia de $\alpha 7$. No fue posible detectar corrientes colinérgicas en ovocitos inyectados con ARNc derivados de estas construcciones (datos no mostrados).

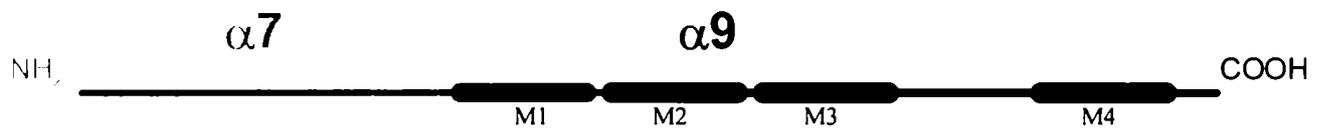


Figura 30 - La subunidad quimérica $\alpha 7(244)\alpha 9$

Para obtener la subunidad quimérica $\alpha 7(244)\alpha 9$ cuya estructura primaria se ilustra en el esquema, se construyó mediante una serie de PCRs un ADNc que comprende la secuencia codificante de la subunidad $\alpha 7$ (trazo gris) desde el extremo aminoterminal hasta el comienzo del segmento M2 y la secuencia de la subunidad $\alpha 9$ (trazo negro) desde ese punto hasta su extremo carboxiterminal.

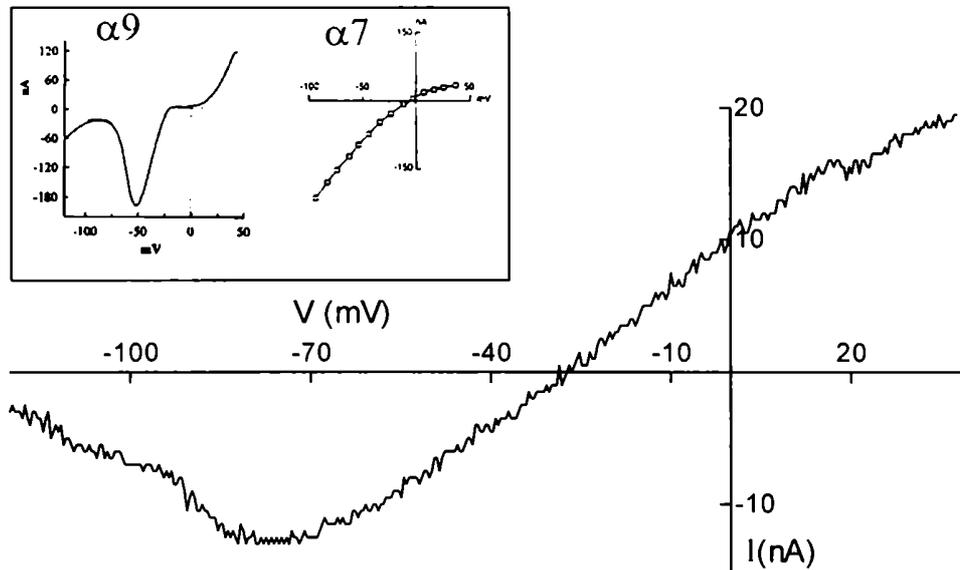


Figura 31 - Relación corriente potencial del receptor $\alpha 7(244)\alpha 9$

Trazo representativo de curvas I-V generadas por aplicación de una rampa de voltaje (+40 a -120 mV, 2 seg, $V_{sostén} = -70$ mV) durante la aplicación de ACh 100 μ M sobre un ovocito inyectado con ARNc $\alpha 7(244)\alpha 9$ (n=3). *Recuadro*: Curvas I-V correspondientes a los receptores $\alpha 9$ y $\alpha 7$ (Reproducidas de Elgoyhen et al., 1994 y Eisélé et al., 1993, respectivamente)

Al comparar la secuencia aminoacídica del segmento hidrófobo M2 de la subunidad $\alpha 9$ con las de otras subunidades nicotínicas α , se encuentran algunas pocas diferencias (Figura 32).



Figura 32 - Alineación de las secuencias aminoacídicas de los segmentos M2 de las subunidades de receptores nicotínicos $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\alpha 8$ y $\alpha 9$.

Todas las secuencias corresponden a subunidades de rata excepto $\alpha 8$, de pollo. El sombreado negro indica identidad de secuencia. Las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$ y $\alpha 9$ son capaces de formar receptores homoméricos y forman un subgrupo dentro del grupo de subunidades α . La flecha señala la posición 261 (numeración $\alpha 9$)

En particular se observa una sustitución no conservativa en la posición 261 (numeración $\alpha 9$) en la que los aminoácidos no polares leucina en $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$ y metionina en $\alpha 7$ y $\alpha 8$ son sustituidos por el aminoácido polar glutamina en $\alpha 9$.

Ha sido demostrado que un residuo de glutamina en la región del poro del canal de receptores de glutamato tipo AMPA y uno de asparagina en el de tipo NMDA son determinantes estructurales de la interacción con cationes divalentes y de las propiedades de rectificación de estos canales¹⁵⁰. Con el objeto de poner a prueba la hipótesis de que este residuo de glutamina está involucrado en la permeabilidad a Ca^{++} y en el bloqueo dependiente de voltaje por este mismo catión se realizó una mutación puntual en el receptor $\alpha 9$ en la que se reemplazó la glutamina en posición 261 por metionina. Las curvas I-V realizadas sobre la corriente colinérgica en ovocitos inyectados con la subunidad mutante $\alpha 9(\text{Q}261\text{M})$ no presentan rectificación en la región de potenciales menores a -50 mV (Figura 33). Esta es una clara diferencia con lo observado en el caso del receptor $\alpha 9$ (*Recuadro* en Figura 33). Esta diferencia podría deberse a que el residuo glutamina en la posición 261 de la subunidad $\alpha 9$ está involucrado directa o alostéricamente en la interacción de iones Ca^{++} con el receptor y el resultante bloqueo dependiente de voltaje. El cambio de glutamina por metionina disminuiría significativamente esta interacción. Las limitaciones en cuanto a la amplitud de las corrientes obtenidas en la mayoría de los ovocitos inyectados con la subunidad mutada impidieron la realización de experimentos dirigidos a evaluar el efecto de cambios en la concentración extracelular de Ca^{++} sobre la respuesta del receptor homomérico $\alpha 9(\text{Q}261\text{M})$.

¹⁵⁰ (Burnashev et al., 1992; Burnashev et al., 1992; Egebjerg and Heinemann, 1992; Mori et al., 1992; Wollmuth et al., 1996)

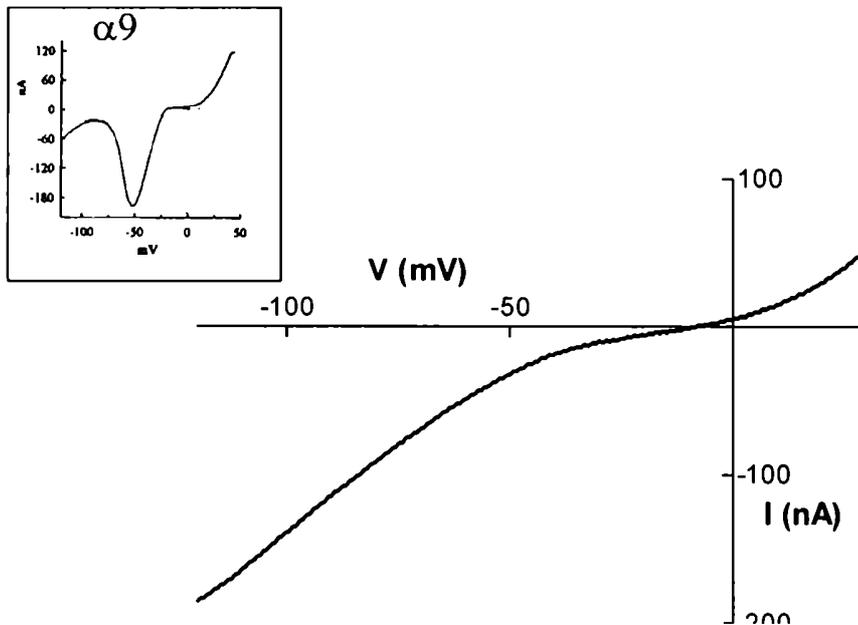


Figura 33 - Relación corriente potencial del receptor $\alpha 9$ (Q261M)

Trazo representativo de curvas I-V generadas por aplicación de una rampa de voltaje (+40 a -120 mV, 2s, $V_{\text{sostén}} = -70$ mV) durante la aplicación de ACh 100 μM sobre un ovocito inyectado con ARNc $\alpha 9$ (Q261M) (n=3).

Recuadro: Curva I-V correspondiente al receptor $\alpha 9$ (Reproducida de Elgoyhen et al., 1994)

4.4.3]

La mutación del residuo glutamina-261 por metionina en la subunidad $\alpha 9$, modifica el efecto del Ca^{++} sobre el receptor heteromérico $\alpha 9:\alpha 10$.

Avanzado ya el trabajo que aquí se presenta, la clonación molecular de la subunidad de receptores nicotínicos $\alpha 10$ permitió su coexpresión heteróloga junto con la subunidad $\alpha 9$, formando un receptor heteromérico $\alpha 9:\alpha 10$ funcional¹⁵¹. Los ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con ARNc $\alpha 9$ y $\alpha 10$ (1:1) responden a la aplicación de ACh con corrientes de 1 a 3 órdenes de magnitud mayores en amplitud a las obtenidas con el receptor homomérico $\alpha 9$; mientras que no es posible detectar respuestas colinérgicas en ovocitos inyectados únicamente con ARNc $\alpha 10$ ¹⁵². Al igual que lo descrito para el receptor homomérico $\alpha 9$, Elgoyhen et al.¹⁵³ observaron que la incubación con BAPTA-AM de los ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con ARNc $\alpha 9$ y $\alpha 10$ resulta en una reducción de la magnitud de las corrientes colinérgicas en aproximadamente 80 % (Figura 34 y Elgoyhen et al., 2001). Este resultado, concluyen los autores, es consistente con la presencia de un receptor $\alpha 9:\alpha 10$ permeable a Ca^{++} . También observan que el potencial de reversión para este receptor, cercano a -10 mV en coincidencia con el de $\alpha 9$, es compatible con un canal catiónico no selectivo. El trabajo citado y experimentos realizados por Weisstaub y Katz en el laboratorio de la Dra. Elgoyhen muestran algunas características distintivas del receptor heteromérico $\alpha 9:\alpha 10$ relevantes para la comparación con los resultados que se presentan más adelante. En primer lugar, el canal $\alpha 9:\alpha 10$ presenta, al igual que $\alpha 9$, considerable rectificación alrededor del potencial

¹⁵¹ (Elgoyhen et al., 2001)

¹⁵² (Elgoyhen et al., 2001)

¹⁵³ (Elgoyhen et al., 2001)

de reversión, sin embargo a potenciales más hiperpolarizados las corrientes generadas por $\alpha 9:\alpha 10$ tienen amplitudes sustancialmente mayores (Figura 9). La amplitud de las corrientes producidas por ACh en ovocitos inyectados con ARNc $\alpha 9$ y $\alpha 10$ son afectadas por la concentración extracelular de Ca^{++} : las respuestas son potenciadas por Ca^{++} en concentraciones submilimolares, e inhibidas por concentraciones de Ca^{++} en el rango milimolar. Por otra parte, el receptor $\alpha 9:\alpha 10$ se desensibiliza dado que las respuestas se reducen marcadamente con la aplicación continua de ACh $100 \mu M$ ¹⁵⁴. También se observa la desensibilización progresiva de la respuesta con aplicaciones sucesivas de ACh $100 \mu M$ en pulsos de 10 seg separados por intervalos de 30 seg (Figura 9)¹⁵⁵.

Partiendo de la evidencia recogida en los experimentos con el receptor homomérico mutado $\alpha 9(Q261M)$ se investigó el efecto de esa mutación en la función del receptor heteromérico. La coinyección de ARNc $\alpha 9(Q261M)$ y $\alpha 10$ resultó en la expresión de un receptor colinérgico funcional. Las respuestas obtenidas fueron, al igual que en el caso de $\alpha 9:\alpha 10$, considerablemente mayores a las obtenidas con los receptores homoméricos $\alpha 9$ y $\alpha 9(Q261M)$. Las respuestas a ACh $100 \mu M$ se redujeron en aproximadamente 80% luego de tratar los ovocitos con BAPTA-AM por 4 hs., lo cual sugiere que el receptor $\alpha 9(Q261M):\alpha 10$ es permeable a Ca^{++} (Figura 34). Los experimentos con este receptor que se describen a continuación fueron todos realizados en ovocitos preincubados con BAPTA-AM para, de esa manera, eliminar la interferencia de la corriente secundaria de Cl^- . La forma de las respuestas observadas en ovocitos inyectados con

¹⁵⁴ (Elgoyhen et al., 2001)

¹⁵⁵ (Elgoyhen et al., 2001)

ARNc de las subunidades $\alpha 9(Q261M)$ y $\alpha 10$ (1:1) no difiere apreciablemente de las correspondientes al receptor $\alpha 9:\alpha 10$, observándose la disminución de la respuesta con la aplicación continua de agonista, así como también con aplicaciones sucesivas (datos no mostrados). Esta característica de la respuesta, se suma a la evidencia provista por la diferencia de amplitud de respuesta entre ovocitos inyectados con ARNc $\alpha 9(Q261M)$ y $\alpha 10$, y sólo con ARNc $\alpha 9(Q261M)$, para poder afirmar que las respuestas observadas se deben efectivamente a la expresión de un receptor heteromérico formado por las subunidades $\alpha 9(Q261M)$ y $\alpha 10$.

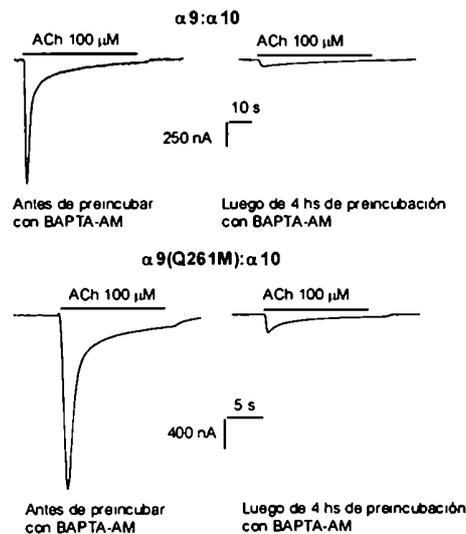


Figura 34 - Permeabilidad al Ca^{++} de los receptores $\alpha 9:\alpha 10$ y $\alpha 9(Q261M):\alpha 10$.

Trazos representativos de la respuesta a $ACh\ 100\ \mu M$ a $-90\ mV$ antes (*izquierda*) y después (*derecha*) de la preincubación por 4 hs. con BAPTA-AM. La reducción de las respuestas tanto de $\alpha 9:\alpha 10$ (*arriba*) como de $\alpha 9(Q261M):\alpha 10$ (*abajo*) se debe a la desaparición de la corriente de Cl^- dependiente de Ca^{++} intracelular. La diferencia en la magnitud de las respuestas entre los dos receptores (las escalas son diferentes) se debe a la variabilidad entre experimentos propia del sistema de expresión.

Las respuestas a ACh 10 μ M de ovocitos que expresaban el receptor $\alpha 9(Q261M):\alpha 10$ aumentaron significativamente al elevar la concentración de Ca^{++} extracelular desde 0.2 a 1.8 mM, en contraste con lo observado para $\alpha 9:\alpha 10$ (Figuras 35 y 36). A diferencia de lo observado con el receptor silvestre $\alpha 9:\alpha 10$, al pasar a Ca^{++} 3 mM extracelular, las respuestas de $\alpha 9(Q261M):\alpha 10$ no disminuyen (Figura 36). Estos resultados sugieren que la sustitución de la subunidad $\alpha 9$ por $\alpha 9(Q261M)$ en el receptor heteromérico produce una disminución del bloqueo de la respuesta a ACh por el Ca^{++} , mientras que, el efecto potenciador observable a concentraciones bajas del ion (< 0.5 mM) se mantendría. El efecto potenciador del Ca^{++} sobre la respuesta a ACh es más evidente en el receptor $\alpha 9(Q261M):\alpha 10$ que en el $\alpha 9:\alpha 10$ debido probablemente a que en el primer caso dicho efecto no se vería enmascarado por el bloqueo. La relación I-V de las corrientes colinérgicas de ovocitos que expresan el receptor $\alpha 9(Q261M):\alpha 10$ presentan las mismas características descritas para $\alpha 9:\alpha 10$, sin embargo, al elevar la concentración de Ca^{++} extracelular se observa un aumento de la amplitud de la corriente en todo el rango de voltajes cubierto por la rampa aplicada (-120 a +40 mV), contrariamente a lo observado con $\alpha 9:\alpha 10$ en cuyas curvas se observa que la amplitud de la corriente disminuye con el aumento de la concentración de Ca^{++} extracelular (Figura 35).

De los resultados aquí presentados se puede inferir que el efecto bloqueante del Ca^{++} extracelular se ve atenuado significativamente al introducir la mutación glutamina-261 por metionina en la subunidad $\alpha 9$.

La subunidad $\alpha 10$ que conserva en la posición 261 un residuo de glutamina, también fue mutada, obteniéndose la subunidad $\alpha 10(Q261M)$. El patrón de

sensibilidad al Ca^{++} extracelular observado para las respuestas de ovocitos inyectados con los ARNc de las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10(\text{Q261M})$ (1:1), fueron prácticamente indistinguibles de lo reportado para el receptor $\alpha 9:\alpha 10$ (Figura 36). La falta de coincidencia entre el resultado de introducir la mutación glutamina-261 por metionina en una u otra subunidad constituye un indicio de una contribución no simétrica de cada una de estas subunidades a la función del receptor $\alpha 9:\alpha 10$. No se detectaron respuestas en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con una combinación (1:1) de los ARNc de las subunidades $\alpha 9(\text{Q261M})$ y $\alpha 10(\text{Q261M})$ (datos no mostrados). Con la metodología experimental utilizada no es factible responder a la pregunta de si esto es debido a una falla en el ensamble y expresión en membrana del receptor o a un defecto funcional de un receptor que se ensambla e integra normalmente en la membrana.

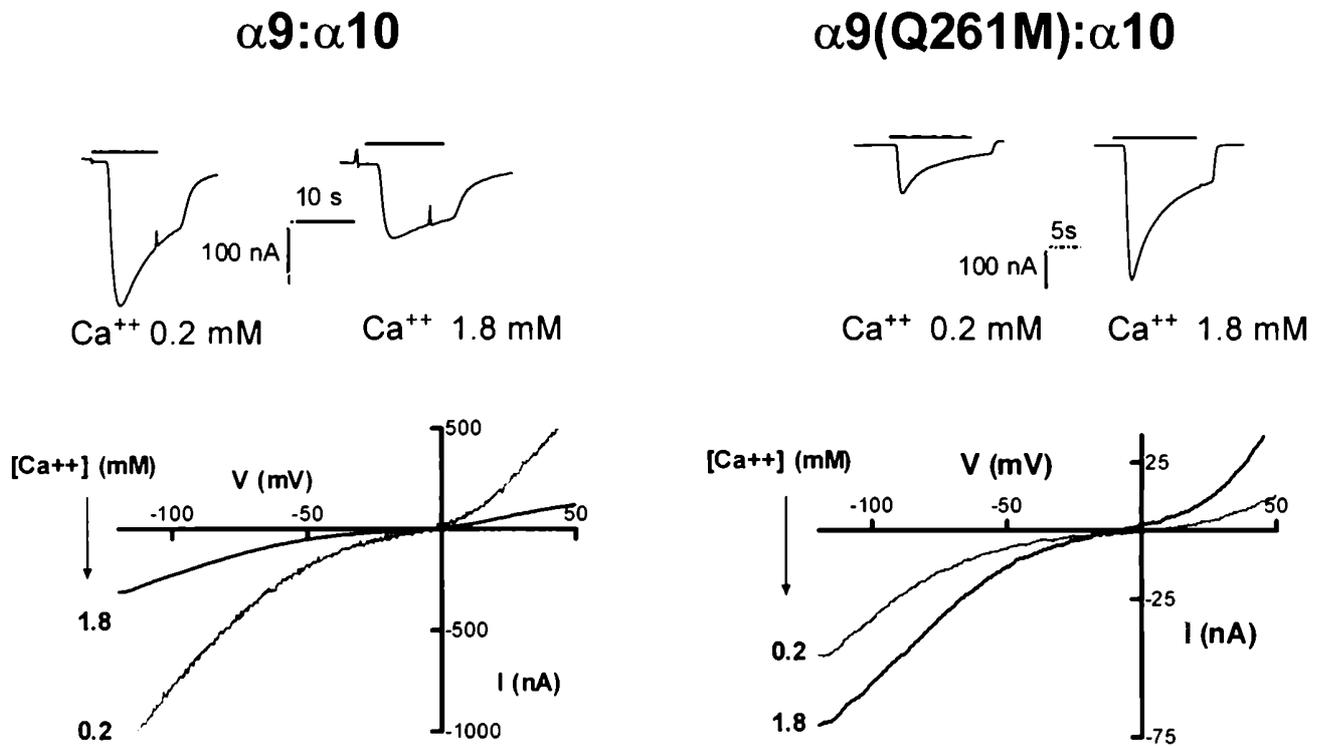


Figura 35 - Efecto de la mutación α9(Q261M) en la sensibilidad al Ca⁺⁺ del receptor heteromérico α9:α10

Arriba: Trazos representativos de la respuesta a ACh 10 μM a -90 mV de ovocitos inyectados con una mezcla equimolar de ARNc α10 y α9 (*izquierda*) o α9(Q261M) (*derecha*). El efecto de cambiar la concentración extracelular de Ca⁺⁺ de 0.2 mM a 1.8 mM se invierte al introducir la subunidad α9 mutada (n=9).

Abajo: Trazos representativos de curvas I-V obtenidas por la aplicación de una rampa de voltaje (-120 mV a +40 mV, 2s) 10 s después de alcanzado el pico de corriente evocada por ACh 10 μM. El efecto de introducir la mutación α9(Q261M) también se observa aquí. La relación entre las curvas obtenidas en Ca⁺⁺ 1.8 mM (*trazo negro*) y en Ca⁺⁺ 0.2 mM (*trazo gris*) se invierte (n=5).

Los ovocitos fueron preincubados con BAPTA-AM por 4hs antes de los experimentos.

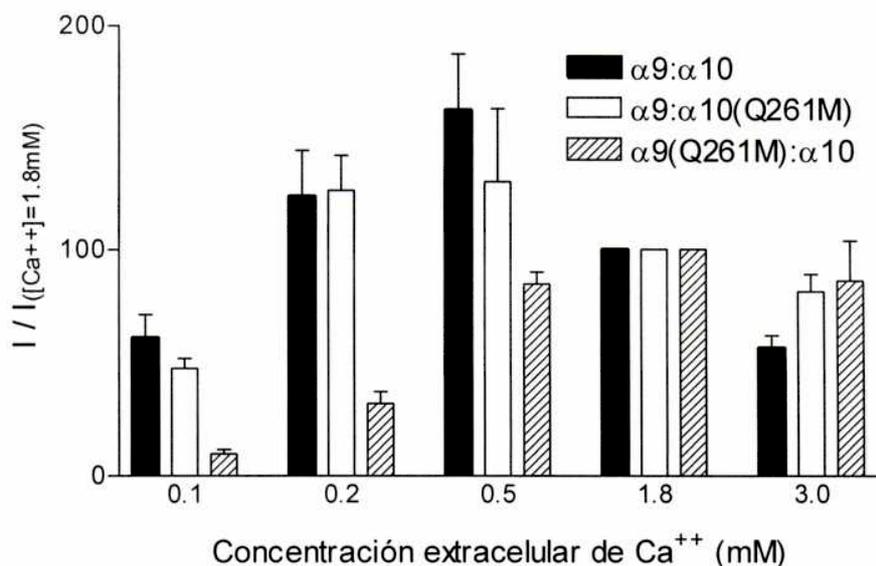


Figura 36 - Efecto del Ca⁺⁺ extracelular sobre la amplitud de las respuestas a ACh de los receptores $\alpha 9:\alpha 10$, $\alpha 9(Q261M):\alpha 10$ y $\alpha 9:\alpha 10(Q261M)$

Gráfico de barras mostrando la amplitud normalizada de las respuestas a ACh 10 μM a 90 mV, a distintas concentraciones de Ca⁺⁺ extracelular, de los receptores $\alpha 9:\alpha 10$ (barras negras), $\alpha 9:\alpha 10(Q261M)$ (barras blancas) y $\alpha 9(Q261M):\alpha 10$ (barras rayadas). Las corrientes fueron normalizadas con respecto a la corriente alcanzada en Ca⁺⁺ 1.8 mM para cada ovocito. Cada barra representa el promedio \pm error estándar de los valores normalizados expresados como porcentajes (n = 9 a 15).

5]

DISCUSIÓN

5.1]

La subunidad $\alpha 9$ de receptores nicotínicos posee características farmacológicas mixtas nicotínicas muscarínicas coincidentes con las observadas en el receptor colinérgico nativo de las células ciliadas del oído interno.

El presente estudio contribuye a la caracterización farmacológica del receptor colinérgico nicotínico recombinante $\alpha 9$ y muestra que este receptor es sensible a compuestos selectivos para receptores tanto nicotínicos ionotrópicos como muscarínicos metabotrópicos. Estos resultados apoyan la afirmación de que este receptor es un miembro atípico de la familia de los receptores nicotínicos.

Entre los compuestos colinérgicos ensayados sobre el receptor $\alpha 9$, sólo el agonista nicotínico metilcarbacol y la colina así como el agonista colinérgico no selectivo carbacol produjeron respuestas máximas o cercanas al máximo en comparación con la ACh. Todas las otras drogas ensayadas fueron o agonistas parciales muy débiles o antagonistas de este receptor. Una característica común a todos los compuestos que se comportaron como agonistas de $\alpha 9$ es la presencia de un grupo amonio cuaternario (ver Apéndice), sugiriendo que una carga positiva neta en el átomo de nitrógeno es necesaria para la activación del receptor. La observación de que

compuestos cargados como la muscarina y el betanecol no produjeron respuestas, podría derivarse del hecho de la presencia de otros factores estéricos que pueden limitar la accesibilidad del átomo de nitrógeno cargado a los sitios de unión de activación.

La colina, un precursor de la síntesis y un producto de hidrólisis de la ACh, fue descrita como un agonista selectivo del receptor homomérico nicotínico $\alpha 7$ ¹⁵⁶ y como un agonista parcial y un coagonista competitivo del receptor nicotínico $\alpha 4\beta 4$ ¹⁵⁷. Se ha reportado que las concentraciones de colina libre varían entre 10 a 40 μM y entre 4 y 12 μM en plasma sanguíneo y en el fluido cerebroespinal respectivamente¹⁵⁸. No obstante el efecto de concentraciones tan altas como 1 mM adquiere relevancia fisiológica ya que tales concentraciones se alcanzan transitoriamente en las sinapsis¹⁵⁹.

La unión de los agonistas al receptor colinérgico ionotrópico favorece cambios conformacionales que llevan a la transición de un estado cerrado no conductor a un estado activo, abierto. Una amplia gama de eficacias y afinidades aparentes para distintos agonistas nicotínicos¹⁶⁰ han sido determinadas para los receptores nicotínicos clonados e incluso se ha reportado un efecto antagonista de la nicotina sobre el receptor $\alpha 3\beta 2$ de pollo¹⁶¹. Sin embargo, el receptor $\alpha 9$ parece ser único dentro de la subfamilia de los receptores nicotínicos en cuanto que ni la nicotina, ni la citisina o la epibatidina son agonistas de este receptor. Más aún, tanto la

¹⁵⁶ (Alkodon et al., 1997; Papke and Thinschmidt, 1998)

¹⁵⁷ (Zwart and Vijverberg, 2000)

¹⁵⁸ (Klein et al., 1992)

¹⁵⁹ (Land et al., 1981)

¹⁶⁰ (Boulter et al., 1987; Chavez-Noriega et al., 1997; Deneris et al., 1991; Gerzanich et al., 1994; Hussy et al., 1994)

¹⁶¹ (Hussy et al., 1994)

nicotina, como la citisina y la epibatidina bloquearon las corrientes evocadas por la ACh en ovocitos inyectados con ARNc $\alpha 9$, aparentemente mediante un mecanismo competitivo, indicando que el sitio de unión de estos compuestos coincide, o al menos se superpone parcialmente con el de la ACh.

Entre los antagonistas nicotínicos cuyos efectos sobre el receptor $\alpha 9$ fueron estudiados, la MLA fue el más potente. Este resultado es consistente con la observación previa¹⁶² de que $\alpha 9$ también es bloqueado por la α -bungarotoxina, siendo la MLA selectiva para los receptores colinérgicos con afinidad por la α -bungarotoxina en neuronas del SNC¹⁶³ que contienen la subunidad $\alpha 7$.

La sensibilidad de los receptores muscarínicos por la atropina esta generalmente dentro del rango nanomolar¹⁶⁴. A estas concentraciones, se cree que este antagonista muscarínico tiene escaso o ningún efecto sobre los receptores nicotínicos. Se requiere de concentraciones de atropina en el extremo superior del rango micromolar para bloquear receptores nicotínicos musculares o ganglionares¹⁶⁵. A diferencia de lo reportado para otros receptores nicotínicos¹⁶⁶, los resultados aquí presentados muestran que tanto la atropina como la galamina tienen efecto inhibitorio sobre el receptor homomérico $\alpha 9$ a concentraciones micromolares bajas y nanomolares. Por otro lado, si bien el bloqueo del receptor $\alpha 4\beta 4$ por la atropina es de tipo no competitivo¹⁶⁷, el bloqueo de $\alpha 9$ por este compuesto pudo ser revertido

¹⁶² (Elgoyhen et al., 1994; Johnson et al., 1995)

¹⁶³ (Ward et al., 1990)

¹⁶⁴ (Fukuda et al., 1987; Richards, 1991)

¹⁶⁵ (Connor et al., 1983; Fetz et al., 1977)

¹⁶⁶ (Gerzanich et al., 1994; Zwart and Vijverberg, 1997)

¹⁶⁷ (Zwart and Vijverberg, 2000)

umentando la concentración de ACh, un resultado compatible con un bloqueo de tipo competitivo.

La sensibilidad del receptor homomérico $\alpha 9$ al bloqueo por atropina y la galamina es semejante a la encontrada para el caso del compuesto nicotínico clásico epibatidina. Por otro lado, la potencia de bloqueo de estos antagonistas muscarínicos fue mayor que la observada para los compuestos nicotínicos nicotina, citisina, mecamilamina y DH β E. Estos resultados llevan a concluir que el receptor $\alpha 9$ no es diferencialmente sensible a distintos compuestos según sean estos nicotínicos o muscarínicos. Una excepción a esto último es la alta sensibilidad del receptor $\alpha 9$ a la α -bungarotoxina y a la MLA. No obstante, esto está de acuerdo con la observación de que cuando estas toxinas son activas, como lo son sobre los receptores $\alpha 7$ y $\alpha 8$, presentan una muy alta potencia de bloqueo¹⁶⁸.

Se ha postulado que un átomo de nitrógeno cargado positivamente y un aceptor de enlaces puente de hidrógeno separados por 5.9 Å son los elementos esenciales de un agonista nicotínico¹⁶⁹. La comparación de las estructuras obtenidas por difracción de rayos X de agonistas nicotínicos clásicos como la anatoxina, la nicotina, la citisina y el DMPP sugieren que anillos no saturados de estos compuestos constituyen estructuras planas que guardan una relación estérica con el grupo amonio similar en los distintos agonistas, y que, por lo tanto, participarían en la unión al receptor, probablemente interactuando con grupos planos en la proteína¹⁷⁰. En compuestos sin anillo aromático, como la ACh, aún es posible observar un grupo plano insaturado, como el carbonilo, en una posición comparable a la

¹⁶⁸ (Couturier et al., 1990; Gerzanich et al., 1994; Palma et al., 1996)

¹⁶⁹ (Beers and Reich, 1970; Karlin and Akabas, 1995)

¹⁷⁰ (Barlow and Johnson, 1989; Cooper et al., 1996)

del anillo piridínico de la nicotina. Se ha sugerido que la función del grupo acetilo es la de ser un factor permisivo para la activación de los receptores neuronales nicotínicos $\alpha 7$, más que una característica necesaria¹⁷¹. Este podría ser el caso también del receptor $\alpha 9$, en cuanto que la estabilización del estado abierto podría alcanzarse sólo con la unión de un grupo amonio, cargado positivamente. Esto sería compatible no sólo con la acción agonista de compuestos colinérgicos inespecíficos y nicotínicos como ACh, carbacol, metilcarbacol, suberildicolina y DMPP, sino también con la activación por colina y con el efecto agonista parcial de los agonistas muscarínicos, metilfurrettonio, McN-A-343 y oxotremorina-M. La menor eficacia relativa del DMPP, el metilfurrettonio, el McN-A-343 y la oxotremorina-M podría deberse, entonces, a una menor localización de la carga positiva sobre el átomo de nitrógeno cuaternario en dichos compuestos. Por otra parte el antagonismo competitivo observado con otros compuestos tanto nicotínicos como muscarínicos podría explicarse por la ausencia de un grupo amonio cuaternario o por la presencia de grupos más voluminosos y/o más hidrofóbicos alrededor del átomo de nitrógeno cuaternario, teniendo en cuenta también que una mayor rigidez se asocia con antagonismo. Esta hipótesis es compatible no sólo con el bloqueo competitivo por compuestos como la atropina y la epibatidina sino también con la ausencia de efecto agonista del betanecol, difícil de explicar de otra manera. Llevando la especulación un poco más adelante podría inferirse entonces, que el mecanismo de activación implica el acercamiento en la estructura tridimensional de la proteína de residuos con densidad de carga negativa que interactuarían con la carga positiva del grupo amonio, este reacomodamiento

¹⁷¹ (Papke et al., 1996)

sería sensible a factores estéricos y a la presencia de grupos hidrófobos, como el metilo en posición β del betanecol o la estructura cíclica de la epibatidina. Adicionalmente un factor permisivo sería la interacción entre residuos aromáticos de la proteína y una estructura plana insaturada en la molécula del agonista, como el grupo carbonilo de la ACh o el fenilo del DMPP.

En el caso del McN-A-343 se observó agonismo parcial con un rebote de la respuesta ante el lavado que podría explicarse por un bloqueo de canal abierto por la molécula del agonista. Al estudiar la acción agonista de la d-tubocurarina en un receptor $\alpha 7$ mutado, Bertrand et al.¹⁷² observan un rebote en la corriente similar al reportado aquí. En el mismo trabajo los autores estiman que la d-tubocurarina atraviesa un 20% del potencial transmembranal para alcanzar su sitio de unión y concluyen que el rebote observado sería debido a un bloqueo del canal por la misma molécula que actúa como agonista. Esta interpretación es coincidente con el análisis hecho por Sine et al.¹⁷³ sobre el bloqueo de receptores nicotínicos por altas concentraciones de agonistas.

De acuerdo con los resultados reportados y a los presentados en este trabajo el receptor homomérico $\alpha 9$ y el $\alpha 9:\alpha 10$ parecerían ser muy similares farmacológicamente¹⁷⁴. Esto podría deberse a una contribución asimétrica de ambas subunidades en la función del receptor $\alpha 9:\alpha 10$, siendo la subunidad $\alpha 9$ la principal responsable de las características farmacológicas del receptor heteromérico. Alternativamente, la alta identidad entre ambas subunidades podría implicar que todos los residuos esenciales para determinar las

¹⁷² (Bertrand et al., 1992)

¹⁷³ (Sine and Steinbach, 1984)

¹⁷⁴ (Elgoyhen et al., 1994; Elgoyhen et al., 2001; Verbitsky et al., 2000)

propiedades farmacológicas coincidentes entre el receptor homomérico y el heteromérico se encuentren conservados en ambas proteínas. De todas maneras, no es posible descartar que en el futuro se encuentren diferencias farmacológicas entre ambos receptores.

El perfil farmacológico inusual que aquí y en reportes previos se ha descrito para el receptor homomérico $\alpha 9$ ¹⁷⁵ es notablemente similar al del receptor de ACh de las CCE y CCV¹⁷⁶. Así, ambos receptores son activados por ACh, suberildicolina, DMPP, McN-A-343 y carbacol, pero no por nicotina, citisina ni muscarina. Más aún, ambos receptores son bloqueados por nicotina, d-tubocurarina, atropina, estricnina, morfina y bicuculina. Finalmente, a diferencia de lo que ocurre con el receptor muscular y el $\alpha 7$, el bloqueo por α -bungarotoxina del receptor $\alpha 9$ y del receptor colinérgico de las CCE es reversible. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que el o los receptores colinérgicos de las células ciliadas tienen por componente fundamental a la subunidad $\alpha 9$ (Tabla 3).

¹⁷⁵ (Elgoyhen et al., 1994; Rothlin et al., 1999; Verbitsky et al., 2000)

¹⁷⁶ (Blanchet et al., 1996; Chen et al., 1996; Dulong et al., 1998; Erostequi et al., 1994; Evans, 1996; Fuchs and Murrow, 1992; Housley and Ashmore, 1991; Kakehata et al., 1993; McNiven et al., 1996)

Compuesto	Células ciliadas	$\alpha 9$
ACh	agonista ^{a-j} EC ₅₀ (μ M): 7; 13.5, 17 (cobayo) 4,8,9 22 (pollo) ^{l0}	agonista ^{k,n} EC ₅₀ : 11.4 μ M
carbacol	agonista ^{b,d,i,j} EC ₅₀ : 87 μ M	agonista ⁿ EC ₅₀ : 63.7 μ M
DMPP	agonista parcial ^{b,d,i,j}	agonista parcial ^k
suberildicolina	agonista parcial ^{b,d,i,j}	agonista parcial ⁿ
McN-A-343	agonista parcial ^{b,d,i,j}	agonista parcial y bloqueante de canal abierto ⁿ
nicotina	antagonista ^j IC ₅₀ : rango μ M	antagonista ^{k,n} competitivo ⁿ IC ₅₀ : 31.5 μ M
citisina	sin actividad agonista ^{b,d,j}	antagonista ^{k,n} competitivo ⁿ IC ₅₀ : 43.1 μ M
muscarina	sin actividad agonista ^{b,d,j}	antagonista ^{k,n} IC ₅₀ : 83 μ M
α -bungarotoxin	antagonista reversible ^{d,e,g,h} IC ₅₀ : rango nM	antagonista reversible ^{k,l} IC ₅₀ : 4 nM
estricnina	antagonista ^{c,d,g,h} IC ₅₀ : rango nM	antagonista ^{k,m} IC ₅₀ : 17.9 nM
d-tubocurarina	antagonista ^{a,c,d,e,g,h} IC ₅₀ : rango nM	antagonista ^k IC ₅₀ : 300 nM
atropina	antagonista ^{d,g} IC ₅₀ : rango μ M	antagonista ^{k,n} competitivo ⁿ IC ₅₀ : 1 μ M
morfina	antagonista ⁿ IC ₅₀ : 5.3 μ M	antagonista competitivo ⁿ IC ₅₀ : 20 μ M
bicuculina	antagonista ^d IC ₅₀ : \approx 1 μ M	antagonista ^m IC ₅₀ : 0.8 μ M

a: (Blanchet et al., 1996); b: (Chen et al., 1996); c: (Dulon and Lenoir, 1996); d: (Erostegui et al., 1994); e: (Evans, 1996); f: (Fuchs and Murrow, 1992a); g: (Fuchs and Murrow, 1992b); h: (Housley and Ashmore, 1991); i: (Kakehata et al., 1993); j: (McNiven et al., 1996); k: (Elgoyhen et al., 1994); l: (Johnson et al., 1995); m: (Rothlin et al., 1999); n: (Verbitsky et al. 2000); ñ: (Lioudyno, Verbitsky, et al. 2000).

Tabla 3 - Comparación entre las propiedades farmacológicas del receptor nativo de las células ciliadas y del receptor homomérico $\alpha 9$ expresado en ovocitos de *Xenopus laevis*.

La subunidad $\alpha 9$ como $\alpha 10$ son miembros distantes dentro de la subfamilia de receptores nicotínicos, formando un grupo separado en base a la comparación de secuencias (Tabla 4). No obstante el perfil de hidrofobicidad

de la secuencia aminoacídica de la subunidad $\alpha 9$ muestra el mismo patrón que las otras subunidades de la familia de receptores con asa de cisteínas.

	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\alpha 6$	$\alpha 7$	$\alpha 8$	$\alpha 9$
$\alpha 9$	36%	35%	35%	36%	36%	34%	35%	36%	100%
$\alpha 10$	33%	36%	34%	36%	34%	34%	39%	41%	57%

Tabla 4 - Identidad de secuencia entre subunidades nicotínicas α

Presumiblemente, entonces, el receptor $\alpha 9$ tendría un plegamiento similar al de otros receptores de la familia, compartiendo características generales como la topología de cuatro segmentos transmembranales, con el segundo segmento formando el poro del canal, y un gran dominio aminoterminal extracelular conteniendo los determinantes estructurales de los sitios de unión del agonista al receptor. Estas características serían comunes también a las otras subunidades de receptores de asa de cisteína.

Mediante la generación de un receptor quimérico funcional compuesto por el dominio hidrófilo aminoterminal de la subunidad $\alpha 9$ y la subunidad $5HT_{3A}$ desde el comienzo del primer segmento anfipático hasta su extremo carboxiterminal, se ha aportado evidencia experimental compatible con la hipótesis de que la subunidad $\alpha 9$ posee una topología de plegamiento similar a la de la subunidad $5HT_{3A}$ y a las otras subunidades nicotínicas. La similitud estructural entre ambas proteínas es un requisito para el éxito de esta estrategia experimental pues la misma se basa en la presunción de que proteínas homólogas adoptan conformaciones tridimensionales semejantes. Al mismo tiempo se ha demostrado que el dominio aminoterminal que comprende los residuos 1 a 164 posee los determinantes estructurales

responsables de la interacción con la ACh y que confiere al receptor $\alpha 9$ ciertas propiedades farmacológicas distintivas, como la susceptibilidad al bloqueo por MLA. Por otra parte las propiedades biofísicas estudiadas del receptor quimérico difieren de las observadas para $\alpha 9$ y se asemejan a las de $5HT_{3A}$. La misma estrategia experimental fue utilizada anteriormente con la subunidad nicotínica $\alpha 7$ y la serotoninérgica $5HT_{3A}$ por Eiselé et al.¹⁷⁷ Dichos autores postularon a partir de sus resultados el principio de que los distintos dominios de estas proteínas pueden funcionar como unidades relativamente autónomas. A partir de los resultados aquí presentados con la subunidad quimérica $\alpha 9(209)5HT_{3A}$ es posible extender este postulado a los receptores formados por la subunidad $\alpha 9$.

Si bien han sido reportadas mutaciones puntuales en los segmentos hidrófobos de subunidades nicotínicas que afectan su farmacología¹⁷⁸, es razonable suponer que los determinantes estructurales de las propiedades farmacológicas se encuentran principalmente en el dominio extracelular aminoterminal, como lo sugiere el hecho de que la ACh (pero no la serotonina) es capaz de activar el receptor quimérico $\alpha 9(209)5HT_{3A}$. Algunos residuos que se encuentran conservados en los dominios hidrófilos aminoterminal de las subunidades $\alpha 1$ - $\alpha 8$, están sustituidos por aminoácidos disímiles en la secuencia de $\alpha 9$ que podrían estar involucrados en las peculiares características farmacológicas de este receptor. Entre estas sustituciones no conservativas se encuentran la pérdida de una carga positiva neta por el cambio lisina-150 por treonina y la pérdida de un grupo polar por el cambio de tirosina-207 por fenilalanina (numeración $\alpha 9$). Estos dos

¹⁷⁷ (Eisele et al., 1993)

¹⁷⁸ (Bertrand et al., 1992; Briggs et al., 1999; Eaton et al., 2000; Palma et al., 1996)

residuos se localizan en segmentos alineados con el segundo y tercero de los segmentos de la subunidades $\alpha 1^{179}$ y $\alpha 7^{180}$ involucrados en la unión de agonistas y antagonistas no competitivos. Sin embargo la mutación puntual $\alpha 9T150K$ no produjo alteraciones notables en las propiedades farmacológicas estudiadas del receptor $\alpha 9:\alpha 10$ (datos no mostrados). La falta de efectos importantes de esta mutación puede deberse ya sea a que este residuo en particular no este involucrado en la unión de ligandos o a que dicha interacción no se ve significativamente afectada por la sola mutación de este residuo en una sola de las dos subunidades. La imposibilidad de obtener respuestas a ACh en ovocitos inyectados únicamente con ARNc $\alpha 9(T150K)$ (datos no mostrados) podría deberse bien a un problema en la expresión del receptor homomérico mutado o bien a una drástica disminución en la afinidad por la ACh. De hecho la afinidad aparente a la ACh del receptor $\alpha 9(T150K):\alpha 10$ fue menor que la de $\alpha 9:\alpha 10$ ($EC_{50} = 45.5 \pm 4 \mu M, n=3$ y $13.8 \pm 1.7 \mu M, n = 5$, respectivamente, $p<0.05$).

5.2]

Los opioides inhiben en forma directa las respuestas colinérgicas de los receptores $\alpha 9$ y $\alpha 9\alpha 10$: Un posible mecanismo fisiológico de modulación.

Las observaciones realizadas por Lioudyno y Guth en CCV del sáculo de *Rana pipiens* junto con los resultados aquí presentados que demuestran el bloqueo de los receptores $\alpha 9$ y $\alpha 9\alpha 10$ por opioides sugieren un papel

¹⁷⁹ (Dennis et al., 1988; Galzi et al., 1990)

¹⁸⁰ (Galzi et al., 1991)

modulador de los péptidos opioides sobre el receptor colinérgico de las CCV¹⁸¹.

Los receptores de opioides son receptores de siete pasos transmembranales acoplados a proteína G_q y han sido clasificados en tres tipos principales: μ , κ y δ . Los distintos péptidos opioides presentan afinidades diferenciales por estos receptores. Así las endorfinas tienen mayor afinidad por el receptor μ , las dinorfinas por el μ y el κ y las encefalinas por el δ . Los receptores μ son activados por el alcaloide morfina, potente analgésico y droga de abuso, y antagonizados por la naloxona, aunque estas drogas también son capaces de actuar sobre otros receptores de opioides a altas concentraciones. La morfina también es producida en forma endógena en el SNC y el sistema inmune¹⁸².

Ha sido demostrada la coexistencia de endorfinas y ACh en neuronas periféricas preganglionares simpáticas¹⁸³ y en neuronas eferentes de la cóclea¹⁸⁴, sugiriendo la posibilidad de un rol modulador de estos péptidos en la neurotransmisión colinérgica. Esta colocación también fue propuesta para los eferentes vestibulares¹⁸⁵. En el cobayo se obtuvieron evidencias que indican la presencia de colinoacetiltransferasa (ChAT) y de endorfinas en las neuronas que dan origen al sistema eferente lateral olivar que inerva los aferentes cocleares y las CCI¹⁸⁶. Por otra parte se ha encontrado ARNm de péptidos opioides en las neuronas eferentes vestibulares del jerbo. No ha sido reportada la presencia de receptores de opioides en las CCV.

¹⁸¹ (Lioudyno et al., 2000)

¹⁸² (Stefano et al., 2000) y referencias allí citadas.

¹⁸³ (Kondo et al., 1985; Morales et al., 1995)

¹⁸⁴ (Altschuler et al., 1988; Fex and Altschuler, 1981)

¹⁸⁵ (Guth et al., 1998; Ryan et al., 1991)

¹⁸⁶ (Altschuler et al., 1984; Altschuler et al., 1983)

El bloqueo de la respuesta colinérgica de CCV de *Rana pipiens* (Esta especie sólo posee CCVII) por la morfina, la naloxona, la dinorfina B y la endomorfina I y la falla de antagonistas opioides en neutralizar estos efectos¹⁸⁷, sugieren la posible interacción directa entre el receptor colinérgico ionotrópico de dichas células y los opioides.

En el presente trabajo se demostró la inhibición directa del receptor $\alpha 9$ por morfina y del receptor $\alpha 9:\alpha 10$ por endomorfina I y dinorfina B sin la mediación de receptores opioides. Al igual que en las CCV la morfina actuaría a través de un mecanismo de tipo competitivo. Estos resultados constituyen una importante evidencia a favor de la hipótesis de que los efectos de los opioides observados en CCV son debidos a la acción directa sobre el receptor $\alpha 9:\alpha 10$. Estos resultados también sugieren la posibilidad de que las endorfinas modulen la actividad de las CCI de la cóclea a través de su interacción con el receptor homomérico $\alpha 9$ o de otros tipos celulares que expresan receptores conteniendo la subunidad $\alpha 9$.

Se ha podido correlacionar ciertos casos de sordera neurosensorial en humanos con el abuso de opiáceos¹⁸⁸, dicho efecto podría estar causado, al menos en parte, por la acción directa sobre los receptores $\alpha 9:\alpha 10$ y $\alpha 9$.

La interacción directa entre endorfinas y receptores colinérgicos nicotínicos puede resultar de importancia fisiológica en aquellos sitios donde la liberación de endorfinas no se correlaciona con la presencia de sus correspondientes receptores¹⁸⁹.

¹⁸⁷ (Lioudyno et al., 2000)

¹⁸⁸ (Friedman et al., 2000)

¹⁸⁹ (MacMillan et al., 1998)

5.3]

Las respuestas del receptor $\alpha 9$ son bloqueadas por Ca^{++} y Mg^{++} extracelular en concentraciones fisiológicas y en forma dependiente del potencial de membrana

La curva I-V del receptor $\alpha 9$ se aleja considerablemente de la linealidad y muestra una marcada rectificación saliente, lo cual difiere de los otros receptores nicotínicos¹⁹⁰. Sin embargo, esta curva I-V es bastante similar a aquella del componente temprano de la corriente activada por ACh en las CCE de mamíferos¹⁹¹ y en las células ciliadas cortas (CCC) del pollo (equivalentes a las CCE)¹⁹². En el último caso, aunque las corrientes salientes son de mayor amplitud que las entrantes a concentraciones externas fisiológicas de Ca^{++} , sólo se observa una rectificación pronunciada a concentraciones de Ca^{++} muy elevadas, y bajo esta condición, la curva I-V en dichas células es muy similar a la que se obtuvo en este trabajo para el receptor $\alpha 9$, en presencia de BAPTA intracelular para evitar la interferencia de las $\text{ICl}_{(\text{Ca})i}$ endógenas del ovocito de *Xenopus laevis*

El hecho de que el bloqueo por Ca^{++} sea altamente dependiente de voltaje, como lo demuestran los presentes resultados, indica que las interacciones responsables de este efecto, entre los iones Ca^{++} y la proteína, se localizan mayormente dentro del campo eléctrico de la membrana. La alta permeabilidad al Ca^{++} del receptor $\alpha 9$ evidenciada en que la $\text{ICl}_{(\text{Ca})i}$ constituye cerca del 80% de la corriente total evocada por la ACh en

¹⁹⁰ (Bertrand et al., 1990; Ifune and Steinbach, 1991; Ragozzino et al., 1998; Rathouz and Berg, 1994; Sands and Barish, 1992)

¹⁹¹ (Blanchet et al., 1996)

¹⁹² (McNiven et al., 1996)

ovocitos inyectados con ARNc $\alpha 9$ y en el corrimiento del potencial de reversión al variar la concentración de Ca^{++} en ausencia de otros cationes permeantes¹⁹³, es compatible con la hipótesis de que el o los sitios de unión a Ca^{++} responsables del bloqueo de la corriente por este ion se encuentra en el poro del canal y que el bloqueo no es debido principalmente a una acción alostérica inhibitoria del Ca^{++} . De todas maneras no es posible descartar un efecto modulador alostérico de dicho ion, independiente del voltaje y enmascarado por el bloqueo del poro del canal.

Si bien el Ca^{++} reduce la conductancia unitaria tanto en los receptores nicotínicos neuronales como en los musculares, este efecto sólo se observa a concentraciones milimolares de este ion¹⁹⁴. Más aún, en los receptores nicotínicos neuronales el bloqueo no se evidencia al nivel de las corrientes macroscópicas debido a que el efecto potenciador que ejerce el Ca^{++} a través de un sitio de unión en el dominio extracelular supera ampliamente el efecto del bloqueo del canal¹⁹⁵. Por lo tanto, el hecho de que $\alpha 9$ sea bloqueado en forma potente por el Ca^{++} extracelular ($\text{IC}_{50} = 100 \pm 10 \mu\text{M}$) y que, por consiguiente, la corriente despolarizante sea suprimida en forma drástica a concentraciones fisiológicas de Ca^{++} , aparece como una característica particular del receptor $\alpha 9$. En experimentos con las CCE del cobayo y con las CCC del pollo¹⁹⁶, la disminución de la corriente al aumentar la concentración extracelular de Ca^{++} sólo se observa a altas concentraciones del ion ($>10 \text{ mM}$). Esta discrepancia puede deberse a que los experimentos en receptores nativos fueron realizados reemplazando el Ca^{++} por Mg^{++} , ion que también bloquea al receptor $\alpha 9$ (y al receptor $\alpha 9:\alpha 10$). Tampoco puede

¹⁹³ (Elgoyhen et al., 1994; Katz et al., 2000)

¹⁹⁴ (Mulle et al., 1992; Vernino et al., 1992)

¹⁹⁵ (Amador and Dani, 1995; Galzi et al., 1996; Mulle et al., 1992)

¹⁹⁶ (Blanchet et al., 1996; Evans, 1996)

descartarse la posibilidad de que el receptor nativo contenga una subunidad que pudiera conferirle una sensibilidad al Ca^{++} diferente. Sin embargo las evidencias hasta ahora disponibles indican que el receptor de las CCE estaría compuesto por las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$, y el receptor $\alpha 9:\alpha 10$ expresado en ovocitos de *Xenopus laevis* también presenta un bloqueo por concentraciones fisiológicas de Ca^{++} ¹⁹⁷.

A partir de la medición del potencial de reversión a distintas concentraciones de Ca^{++} externo, en experimentos en los cuales los iones monovalentes fueron reemplazados por el catión orgánico no permeante N-metilglucamina, Katz¹⁹⁸ estimó para la relación de permeabilidad $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ un valor de ~ 9 . Dicho reporte sugiere que, por sus propiedades biofísicas, $\alpha 9$ es similar a aquellos canales dependientes de ligando con mayor permeabilidad al Ca^{++} , tales como el receptor $\alpha 7$ ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \approx 10-20$ ¹⁹⁹), los de glutamato²⁰⁰ y algunos de los activados por nucleótidos cíclicos (NGC)²⁰¹ y diferente en este aspecto a los receptores nicotínicos heteroméricos neuronales ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \approx 1.5$ ²⁰²) y musculares ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \approx 0.2-0.3$ ²⁰³), menos permeables a Ca^{++} . Más aún, la fracción de corriente llevada por Ca^{++} a través de $\alpha 9$ sería importante, a concentraciones de Ca^{++} extracelular a las cuales la corriente monovalente se encuentra bloqueada²⁰⁴. Los resultados aquí presentados, junto con los reportados por Elgoyhen et al. y por Katz²⁰⁵ sugieren que las características de selectividad iónica y permeabilidad del receptor $\alpha 9$

¹⁹⁷ (Elgoyhen et al., 2001)

¹⁹⁸ (Katz et al., 2000)

¹⁹⁹ (Bertrand et al., 1993; Sands and Barish, 1991; Séguéla et al., 1993)

²⁰⁰ (Burnashev, 1996; Jahr and Stevens, 1993; Schneggenburger, 1996)

²⁰¹ (Frings et al., 1995)

²⁰² (Fieber and Adams, 1991; Sands and Barish, 1991; Vernino et al., 1992; Vernino et al., 1994)

²⁰³ (Adams et al., 1980; Decker and Dani, 1990)

²⁰⁴ (Elgoyhen et al., 1994; Katz et al., 2000) y resultados aquí presentados.

²⁰⁵ (Elgoyhen et al., 1994; Katz et al., 2000)

parecen estar relacionadas con las de los canales de Ca^{++} dependientes de voltaje²⁰⁶ y con las de los NGC²⁰⁷ y muestran, además, que a concentraciones fisiológicas de Ca^{++} la mayor parte de la corriente despolarizante estaría bloqueada y la corriente remanente tendría una fracción significativa llevada por Ca^{++} . Esto concuerda con el rol fisiológico del receptor nativo de las células ciliadas que es el de incrementar localmente la concentración intracelular de Ca^{++} , llevando a la activación de una corriente de K^+ dependiente de Ca^{++} , y no el de despolarizar la membrana²⁰⁸. De acuerdo a un modelo propuesto para los canales de Ca^{++} , la selectividad de los mismos surgiría debido a la unión del Ca^{++} a un sitio de alta afinidad en el poro del canal. Cuando el Ca^{++} ocupa este sitio, obstruye el pasaje de iones monovalentes y la permeación del Ca^{++} surgiría de la competencia entre varios iones Ca^{++} por este sitio desestabilizando la unión de alta afinidad²⁰⁹.

²⁰⁶ (Almers and McCleskey, 1984)

²⁰⁷ (Frings et al., 1995)

²⁰⁸ (Doi and Ohmori, 1993; Dulon et al., 1998; Erostequi et al., 1994; Evans, 1996; Housley and Ashmore, 1991; Nenov et al., 1998; Ohtani et al., 1994)

²⁰⁹ (McCleskey, 1994)

5.4]

El estudio de la relación estructura - función de las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ revela la importancia del segmento M2 en determinar las propiedades biofísicas de los receptores $\alpha 9$ y $\alpha 9:\alpha 10$. En particular el residuo $\alpha 9Q261$ está implicado en la rectificación y en la interacción de los receptores con los iones divalentes. Estos estudios muestran, además, que las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ no contribuyen en forma simétrica a la función del canal.

Numerosos experimentos de marcación con sondas químicas, mutagénesis dirigida y accesibilidad de cisteínas introducidas por mutación (*SCAM*) indican que el segmento M2 de las subunidades de los receptores nicotínicos muscular y neuronales $\alpha 7$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$ es el componente estructural principal del poro del canal y tapiza su superficie interna²¹⁰. También existe evidencia experimental en favor del mismo rol para el segmento M2 de subunidades de los receptores ionotrópicos de glicina, serotonina y GABA²¹¹.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo con los receptores homoméricos quimérico $\alpha 7(244)\alpha 9$ y $\alpha 9(209)5HT3$ corroboran para el caso de $\alpha 9$ la hipótesis de que el segmento M2 es un constituyente fundamental

²¹⁰ (Akabas et al., 1994; Akabas et al., 1992; Bertrand et al., 1993; Chen and Auerbach, 1998; Filatov and White, 1995; Galzi et al., 1992; Haghghi and Cooper, 2000; Leonard et al., 1988; Murray et al., 1995; Revah et al., 1990; Wilson and Karlin, 1998)

²¹¹ (Betz et al., 1999; Bormann et al., 1993; Chang and Weiss, 1998; Galzi et al., 1992; Gunthorpe et al., 2000; Yakel et al., 1993)

del poro del canal y señalan a este dominio como un determinante estructural clave de las particulares propiedades biofísicas del receptor $\alpha 9$.

La subunidad $\alpha 7(244)\alpha 9$ posee el dominio extracelular y el segmento M1 de $\alpha 7$ y el resto de la proteína, incluyendo el segmento M2, correspondiente a $\alpha 9$. A pesar de lo pequeño de las corrientes obtenidas con estas quimeras, fue posible observar que el receptor $\alpha 7(244)\alpha 9$ presenta una relación I-V muy similar a la del receptor $\alpha 9$ en la región de corriente entrante. La relación I-V reportada para el receptor homomérico $\alpha 7$ difiere claramente de la de $\alpha 9$ en cuanto a que presenta una marcada rectificación entrante y ninguna región de pendiente negativa ni de rectificación saliente²¹². En contraste con $\alpha 7(244)\alpha 9$, la quimera $\alpha 9(209)5HT_{3A}$, que sólo posee el dominio extracelular de $\alpha 9$, presenta una relación I-V prácticamente lineal a voltajes negativos. Tomados en conjunto estos resultados sugieren que la región que se extiende desde el comienzo del segmento M2 hasta el extremo carboxiterminal contiene los determinantes estructurales de la rectificación observada en la curva I-V del receptor $\alpha 9$.

Se ha demostrado que residuos del segmento hidrófobo M2 en las subunidades de receptores nicotínicos están implicados en la rectificación de la corriente, la selectividad iónica, la permeabilidad, la desensibilización y otras propiedades de estos canales. Sin embargo la mayoría de estos residuos se encuentran conservados entre las distintas subunidades nicotínicas, incluyendo $\alpha 9$ y $\alpha 10$, por lo que los determinantes estructurales de las propiedades biofísicas que distinguen a los receptores formados por las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ de otros receptores nicotínicos deben involucrar muy probablemente a aquellos residuos no conservados.

²¹² (Eisele et al., 1993; Galzi et al., 1996; Séguéla et al., 1993)

En particular existe en el segmento M2 de las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ un residuo de glutamina en la posición 261 (Q261). La posición correspondiente se encuentra ocupada por leucina en las subunidades $\alpha 1$ - $\alpha 4$, y por metionina en las subunidades de receptores homoméricos $\alpha 7$ y $\alpha 8$.

En el segmento M2 de subunidades de receptores de glutamato tipo AMPA y tipo kainato existe un residuo de glutamina que, por edición del ARNm, puede ser transformado en arginina y juega un papel importante en determinar la permeabilidad al Ca^{++} y la rectificación de estos receptores. La versión no editada, con glutamina en el "sitio Q/R", confiere a los receptores una mayor permeabilidad al Ca^{++} (~3 veces mayor), al mismo tiempo que una rectificación entrante de la corriente, ausente en la versión editada²¹³. Si bien la topología de plegamiento de las subunidades de receptores de glutamato, con el segmento M2 formando un lazo dentro de la membrana con ambos extremos citoplasmáticos²¹⁴, no sería la misma que la postulada para las subunidades nicotínicas $\alpha 9$ y $\alpha 10$, el segmento M2 contribuye a formar el poro del canal. También las subunidades de receptores de NMDA poseen en la posición alineada con el sitio Q/R un aminoácido con un grupo amida en su cadena lateral: un residuo de asparagina. Estos receptores son altamente permeables al Ca^{++} y son bloqueados por el Mg^{++} extracelular en forma dependiente del voltaje, dando a su curva I-V un aspecto similar a la del receptor $\alpha 9$, con una marcada rectificación saliente y una región de pendiente negativa a potenciales negativos. La mutación de esta asparagina (y de la adyacente en las subunidad NR2A²¹⁵) por glutamina disminuye la permeabilidad al Ca^{++} y el bloqueo por Mg^{++} , removiendo parcialmente la

²¹³ (Burnashev et al., 1992; Egebjerg and Heinemann, 1992; Hume et al., 1991)

²¹⁴ (Bennett and Dingledine, 1995; Hollmann et al., 1994)

²¹⁵ (Wollmuth et al., 1998)

rectificación²¹⁶. La contribución al bloqueo por Mg^{++} de las asparaginas de las distintas subunidades que conforman el receptor de NMDA es asimétrica y ha sido propuesto que los iones divalentes interactuarían directamente con estos residuos²¹⁷.

Todo esto llevó a considerar la hipótesis de que la Q261 en la subunidad $\alpha 9$ podría ser responsable del bloqueo por Ca^{++} dependiente de voltaje del receptor homomérico y de su atípica relación I-V, más semejante a la del receptor de NMDA que a la de otros canales activados por ACh.

Las curvas I-V obtenidas con el receptor homomérico $\alpha 9(Q261M)$ no presentan la marcada rectificación observada con $\alpha 9$, atribuida de acuerdo a los resultados aquí presentados al bloqueo por Ca^{++} , lo cual sugiere que la Q261 estaría involucrada directa o indirectamente en la interacción entre los iones divalentes y el poro del canal que resulta en la disminución de la corriente neta entrante. La dificultad en la obtención de respuestas significativamente mayores al ruido del sistema en ovocitos inyectados con ARNc $\alpha 9(Q261M)$ impidió la utilización de BAPTA intracelular, sin embargo es posible aún comparar las curvas I-V obtenidas con el receptor $\alpha 9(Q261M)$ con aquellas del receptor $\alpha 9$ realizadas también en ausencia de BAPTA²¹⁸. La rectificación, y en particular la región de pendiente negativa, es observable en el receptor $\alpha 9$ tanto en ausencia como en presencia del quelante de Ca^{++} , por lo tanto este fenómeno no puede ser atribuido (al menos no únicamente) a la corriente secundaria de Cl^- . El efecto de la mutación Q261M no podría explicarse totalmente en base a un cambio de

²¹⁶ (Burnashev et al., 1992; Mori et al., 1992; Wollmuth et al., 1998)

²¹⁷ (Wollmuth et al., 1998; Wollmuth et al., 1996)

²¹⁸ (Elgoyhen et al., 1994)

permeabilidad al Ca^{++} , que no puede descartarse ni probarse con los resultados obtenidos.

Debido a la relación señal/ruido tampoco fue posible investigar el efecto de distintas concentraciones extracelulares de Ca^{++} sobre la relación I-V del receptor homomérico mutante. No obstante la clonación de la subunidad $\alpha 10$ permitió estudiar con más detalle el efecto de la mutación de la Q261.

Tanto el receptor $\alpha 9(\text{Q261M}):\alpha 10$, como el $\alpha 9:\alpha 10(\text{Q261M})$, son significativamente permeables a Ca^{++} , al igual que el receptor $\alpha 9:\alpha 10$, como lo demuestra el hecho de que la corriente disminuye en $\sim 80\%$ en presencia de BAPTA intracelular (datos no mostrados). Sin embargo, la mutación Q261M en la subunidad $\alpha 9$ produce una disminución en la sensibilidad del receptor heteromérico al bloqueo por el Ca^{++} externo. La variación de la respuesta a ACh con la concentración de Ca^{++} del receptor $\alpha 9:\alpha 10$ puede explicarse por la superposición de dos efectos: una potenciación por Ca^{2+} , más marcada a concentraciones menores a 0.5 mM, y un bloqueo por el mismo ion, que predomina a concentraciones mayores a 0.5 mM, y que enmascara la potenciación. La potenciación por Ca^{++} de receptores nicotínicos ha sido descrita tanto para receptores nativos como recombinantes²¹⁹ y se ha demostrado que en el receptor $\alpha 7$ los sitios de unión de Ca^{++} responsables de dicho efecto están localizados en el dominio extracelular²²⁰. En este contexto la interpretación más plausible para el perfil de sensibilidad al Ca^{2+} del receptor mutante $\alpha 9(\text{Q261M}):\alpha 10$ sería la de una disminución en la sensibilidad al bloqueo por ese ion que haría más evidente el efecto potenciador del mismo. Sin embargo, no es posible descartar

²¹⁹ (Amador and Dani, 1995; Eisele et al., 1993; Sine et al., 1990; Vernino et al., 1992)

²²⁰ (Galzi et al., 1996)

completamente la alternativa de un aumento en la potenciación a concentraciones bajas de Ca^{++} . La disminución de la corriente a concentraciones milimolares de Ca^{++} no se observa en el receptor $\alpha 9(\text{Q261M}):\alpha 10$ pero si en el receptor $\alpha 9:\alpha 10(\text{Q261M})$. Esto sugiere que ambas subunidades contribuyen en forma asimétrica a la formación del canal y que la Q261 de la subunidad $\alpha 9$ estaría involucrada en el bloqueo por Ca^{++} dependiente de voltaje.

A partir de experimentos de *SCAM* con la subunidad $\alpha 1$, Akabas et al. y Karlin²²¹ concluyen que el segmento M2 tendría estructura de α hélice en el estado abierto y que esta hélice cambiaría su conformación en el estado cerrado, con la estructura helicoidal interrumpida a lo largo de tres residuos. En este modelo el aminoácido alineado con la Q261 de $\alpha 9$ se ubica sobre la hélice en el lado opuesto al lumen del canal. En el caso en que esta sea la situación de la Q261 de $\alpha 9$, los efectos de mutar este residuo deberían explicarse en base a interacciones de este residuo con otras partes de la proteína que afecten su conformación. Un ejemplo de este tipo de interacción quedó demostrado con el análisis de la estructura por difracción de rayos X del canal de K^+ , KcsA, el primer y hasta ahora único canal iónico cuya estructura cristalina se conoce con tal resolución²²². Existe en este canal una secuencia de cuatro aminoácidos, conservada en todos los canales de K^+ . Estos aminoácidos, como se demostró por experimentos de mutagénesis puntual forman el filtro de selectividad de este canal²²³. Sin embargo, la estructura cristalina reveló que las cadenas laterales de estos aminoácidos apuntan fuera del lumen del canal y participan de interacciones específicas

²²¹ (Akabas and Karlin, 1995; Akabas et al., 1994; Karlin and Akabas, 1995)

²²² (Doyle et al., 1998)

²²³ (Choe and Robinson, 1998) y referencias allí citadas.

con otras partes de la proteína, estas interacciones, a su vez, determinan estrictamente el diámetro de anillos de grupos carbonilos formados por la cadena carbonada principal de la proteína. Estos grupos carbonilo son los que interaccionan directamente con los iones permeantes en el lumen del canal. Si bien la estructura de los receptores nicotínicos probablemente no guarde ninguna similitud con la del KscA, el papel que juega el grupo amida de la Q261 de $\alpha 9$ podría ser análogo al de las cadenas laterales en el filtro de selectividad del canal de K^+ . Otra forma en que un residuo en una alfa hélice puede afectar indirectamente las interacciones de otros residuos en la misma hélice es mediante la estabilización de conformaciones dobladas de una hélice α a través de enlaces de puente de hidrógeno entre cadenas laterales de residuos polares y la cadena principal de la proteína²²⁴. Esta posibilidad podría explicar el efecto de mutaciones puntuales en posiciones orientadas hacia fuera del poro, en el marco del modelo propuesto por Unwin en el que los segmentos M2 de las cinco subunidades forman hélices α dobladas, que girarían al cerrarse el canal formando una constricción del poro en el punto de doblez²²⁵. Este modelo, no del todo coincidente con el propuesto por Akabas y Karlin antes mencionado, ha sido apoyado por experimentos de mutagénesis que señalarían al residuo conservado de leucina (L255 en la numeración $\alpha 9/\alpha 10$), en el segmento M2, como responsable de formar la constricción en el punto de doblez²²⁶. Sin embargo esta interpretación fue contradicha por otros autores, que asignan al mismo residuo de leucina un papel en la desensibilización del receptor y no en el cierre del canal²²⁷.

²²⁴ (Sankararamakrishnan and Samsom, 1994)

²²⁵ (Unwin, 1995)

²²⁶ (Labarca et al., 1995)

²²⁷ (Filatov and White, 1995; Revah et al., 1991)

Evidencias presentadas por England et al.²²⁸ que tampoco coinciden con lo propuesto por Akabas y Karlin provienen de experimentos de mutación de la cadena principal de la proteína en la que el enlace amida peptídico es reemplazado por un éster. El modelo que surge de estos datos incluye cambios significativos en la conformación de α hélice de el segmento M2 y localiza esta interrupción de la estructura helicoidal más hacia el extremo extracelular. En éste modelo el residuo alineado con α 9Q261 en la subunidad α 1 está dentro de la región de interrupción de la hélice, lo que permitiría su exposición en el lumen del canal y, por lo tanto su interacción directa con iones permeantes y/o bloqueantes. Esto sería compatible con un sitio de unión de iones Ca^{++} formado por un anillo de glutaminas, análogo al anillo asimétrico de glutamatos descrito en canales de Ca^{++} ²²⁹.

En conjunto, los resultados obtenidos con las subunidades quiméricas α 7(244) α 9, α 9(209)5HT_{3A} y las mutantes α 9(Q261M) muestran que el segmento M2 es un determinante estructural fundamental de la atípica relación corriente - potencial del receptor α 9 y del bloqueo por Ca^{++} extracelular de los receptores α 9 y α 9: α 10. Si bien la interpretación de experimentos con mutaciones puntuales no es unívoca también es posible concluir que la rectificación observada en el receptor α 9 tendría un componente ligado al bloqueo por Ca^{++} que involucraría la interacción directa o indirecta con el residuo α 9Q261.

²²⁸ (England et al., 1999)

²²⁹ (Yang et al., 1993)

6]

CONCLUSIONES

- La subunidad $\alpha 9$ de receptores nicotínicos posee características farmacológicas mixtas nicotínicas - muscarínicas coincidentes con las observadas en el receptor colinérgico nativo de las células ciliadas del oído interno.
- Los opioides inhiben en forma directa las respuestas colinérgicas de los receptores $\alpha 9$ y $\alpha 9\alpha 10$. Esto constituye un posible mecanismo fisiológico de modulación.
- Las respuestas del receptor $\alpha 9$ son bloqueadas por Ca^{++} y Mg^{++} extracelular en concentraciones fisiológicas y en forma dependiente del potencial de membrana.
- El receptor $\alpha 9$ compartiría características estructurales con otros receptores de la familia de canales activados por ligando con asa de cisteína y su porción aminoterminal funciona como un dominio autónomo responsable de la interacción con agonistas como la ACh y antagonistas como la MLA.
- El estudio de la relación estructura - función de las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ revela la importancia del segmento M2 y la región que conecta los segmentos M1 y M2 en determinar las propiedades biofísicas de los receptores $\alpha 9$ y $\alpha 9:\alpha 10$. En particular el residuo $\alpha 9\text{Q261}$ está implicado en la rectificación y en la interacción de los receptores con los iones

divalentes. Estos estudios muestran, además, que las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ no contribuyen en forma simétrica a la función del canal.

71



Ana Belén ELGOYHEN

REFERENCIAS

Adams, D. J., Dwyer, T. M., and Hille, B. (1980). The permeability of endplate channels to monovalent and divalent metal cations. *J Gen Phys* 75, 493-510.

Akabas, M. H., and Karlin, A. (1995). Identification of acetylcholine receptor channel-lining residues in the M1 segment of the alpha subunit. *Biochemistry* 34, 12496-12500.

Akabas, M. H., Kaufmann, C., Archdeacon, P., and Karlin, A. (1994). Identification of acetylcholine receptor channel-lining residues in the entire M2 segment of the alpha subunit. *Neuron* 13, 919-27.

Akabas, M. H., Stauffer, D. A., Xu, M., and Karlin, A. (1992). Acetylcholine receptor channel structure probed in cystein-substitution mutants. *Science* 258, 307-310.

Alkondon, M., Pereira, E. F. R., Cortes, W. S., Maelicke, A., and Albuquerque, E. X. (1997). Choline is a selective agonist of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in rat brain neurons. *Europ. J. Neurosci.* 9, 2734-2742.

Alkondon, M., Pereyra, E. F., Wonnacot, S., and Albuquerque, E. X. (1992). Blockade of nicotinic currents in hippocampal neurons defines methyllycaconitine as a potent and specific receptor antagonist. *Mol. Pharmacol.* 44, 802-808.

Almers, W., and McCleskey, E. W. (1984). Non-selective conductance in calcium channels of frog muscle: calcium selectivity in a single-file pore. *J Physiol (Lond)* 353, 585-608.

Altschuler, R. A., Fex, J., Parakkal, M. H., and Eckenstein, F. (1984). Colocalization of enkephalin-like and choline acetyltransferase-like immunoreactivities in olivocochlear neurons of the guinea pig. *J. Histochem. Cytochem.* 32, 839-843.

- Altschuler, R. A., Parakkal, M. H., and Fex, J. (1983). Localization of enkephalin-like immunoreactivity in acetylcholinesterase-positive cells in the guinea-pig lateral superior olivary complex that project to the cochlea. *Neurosci.* 9, 621-630.
- Altschuler, R. A., Reeks, K. A., Fex, J., and Hoffman, D. W. (1988). Lateral olivochoclear neurons contain both enkephalin and dynorphin immunoreactivities: immunocytochemical co-localization studies. *J. Histochem. Cytochem.* 36, 197-801.
- Amador, M., and Dani, J. A. (1995). Mechanism for modulation of nicotinic acetylcholine receptors that can influence synaptic transmission. *J Neurosci* 15, 4525-32.
- Amar, M., Thomas, P., Johnson, C., Lunt, G. G., and Wonnacott, S. (1993). Agonist pharmacology of the neuronal alpha 7 nicotinic receptor expressed in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett* 327, 284-8.
- Anand, R., Conroy, W. G., Schoepfer, R., Whiting, P., and Lindstrom, J. (1991). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes have a pentameric quaternary structure. *J Biol Chem* 266, 11192-8.
- Anderson, A. D., Troyanovskaya, M., and Wackym, P. A. (1997). Differential expression of alpha2-7, alpha9 and beta2-4 nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNA in the vestibular end-organs and Scarpa's ganglia of the rat. *Brain Res* 778, 409-13.
- Ashmore, J. F. (1987). A fast motile response in guinea pig outer hair cells: the cellular basis of the cochlear amplifier. *J. Physiol. (Lond.)* 388, 323-347.
- Athas, G. B., Chen, C., Bobbin, R. P., and Garcia, M. M. (1997). Nicotinic acetylcholine receptor subunits in outer hair cells of the guinea pig cochlea demonstrated by expression profiling. *ARO Abstracts* 20, 17.
- Athas, G. B., Norris, C. H., Guth, P. S., and Garcia, M. M. (1997). Expression profiling of vestibular hair cells from the frog. *ARO Abstracts* 20, 37.
- Ballivet, M., Patrick, J., Lee, J., and Heinemann, S. (1982). Molecular cloning of cDNA coding for the gamma subunit of Torpedo acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 4466-70.
- Barish, M. E. (1983). A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus* oocyte. *J Physiol (Lond)* 342, 309-25.

- Beers, W. H., and Reich, E. (1970). Structure and activity of acetylcholine. *Nature* 228, 917-922.
- Bennett, J., and Dingledine, R. (1995). Topology profile for a glutamate receptor: three transmembrane domains and a channel-lining reentrant membrane loop. *Neuron* 14, 373-84.
- Bertrand, D., Ballivet, M., and Rungger, D. (1990). Activation and blocking of neuronal nicotinic acetylcholine receptor reconstituted in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1993-7.
- Bertrand, D., Devillers-Thiery, A., Revah, F., Galzi, J. L., Hussy, N., Mulle, C., Bertrand, S., Ballivet, M., and Changeux, J. P. (1992). Unconventional pharmacology of a neuronal receptor mutated in the channel domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1261-1265.
- Bertrand, D., Galzi, J. L., Devillers-Thiery, A., Bertrand, S., and Changeux, J. P. (1993). Mutations at two distinct sites within the channel domain M2 alter calcium permeability of neuronal alpha 7 nicotinic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6971-5.
- Betz, H., Kuhse, J., Schmieden, V., Laube, B., Kirsch, J., and Harvey, R. J. (1999). Structure and functions of inhibitory and excitatory glycine receptors. *Ann N Y Acad Sci* 868, 667-76.
- Blanchet, C., Erostequi, C., Sugawara, M., and Dulon, D. (1996). Acetylcholine-induced potassium current of guinea pig outer hair cells: its dependence on a calcium influx through nicotinic-like receptors. *J Neurosci* 16, 2574-84.
- Blankesteyn, W. M., Siero, H. L., Rodrigues de Miranda, J. F., van Megen, Y. J., and Russel, F. G. (1993). Characterization of muscarinic receptors in rat kidney. *European Journal Of Pharmacology* 244, 21-7.
- 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.
- Bochet, P., Dutriaux, A., Lambolez, B., Nalivaiko, E., Rossier, J., and Prado de Carvalho, L. (1991). A chimeric glutamate receptor subunit: discrete changes modify the properties of the channel. *Biochem Biophys Res Commun* 177, 1183-7.
- Bonner, T. I., Buckley, N. J., Young, A. C., and Brann, M. R. (1987). Identification of a family of muscarinic receptors genes. *Science* 237, 527-531.

Bormann, J., Rundstrom, N., Betz, H., and Langosch, D. (1993). Residues within transmembrane segment M2 determine chloride conductance of glycine receptor homo- and hetero-oligomers [published erratum appears in EMBO J 1994 Mar 15;13(6):1493]. *Embo J* 12, 3729-37.

Boton, R., Dascal, N., Gillo, B., and Lass, Y. (1989). Two calcium-activated chloride conductances in *Xenopus laevis* oocytes permeabilized with the ionophore A23187. *J Physiol (Lond)* 408, 511-34.

Boulter, J., Connolly, J., Deneris, E., Goldman, D., Heinemann, S., and Patrick, J. (1987). Functional expression of two neuronal nicotinic acetylcholine receptors from cDNA clones identifies a gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7763-7767.

Boulter, J., Evans, K., Martin, G., Mason, P., Stengelin, S., Goldman, D., Heinemann, S., and Patrick, J. (1986). Isolation and sequence of cDNA clones coding for the precursor to the gamma subunit of mouse muscle nicotinic acetylcholine receptor. *J Neurosci Res* 16, 37-49.

Boulter, J., Luyten, W., Evans, K., Mason, P., Ballivet, M., Goldman, D., Stengelin, S., Martin, G., Heinemann, S., and Patrick, J. (1985). Isolation of a clone coding for the alpha-subunit of a mouse acetylcholine receptor. *J Neurosci* 5, 2545-52.

Briggs, C. A., McKenna, D. G., Monteggia, L. M., Touma, E., Roch, J. M., Americ, S. P., Gopalakrishnan, M., Sullivan, J. P., Alkondon, M., Pereira, E. F., Eisenberg, H. M., and Albuquerque, E. X. (1999). Gain of function mutation of the alpha7 nicotinic receptor: distinct pharmacology of the human alpha7V274T variant. 366, 2693-2697

Burnashev, N. (1996). Calcium permeability of glutamate-gated channels in the central nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 6, 311-7.

Burnashev, N., Monyer, H., Seeburg, P. H., and Sakmann, B. (1992). Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron* 8, 189-198.

Burnashev, N., Schoepfer, R., Monyer, H., Ruppersberg, J., Gunther, W., Seeburg, P., and Sakmann, B. (1992). Control by asparagine residues of calcium permeability and magnesium blockade in the NMDA receptor. *Science* 257, 1415-1419.

Burnashev, N., Schoepfer, R., Monyer, H., Ruppersberg, J. P., Gunther, W., Seeburg, P. H., and Sakmann, B. (1992). Control by asparagine residues of calcium permeability and magnesium blockade in the NMDA receptor. *Science* 257, 1415-9.

Castro, N. G., and Albuquerque, E. X. (1993). Brief-lifetime, fast-inactivating ion channels account for the alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic response in hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 164, 137-40.

Caulfield, M. P. (1993). Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacology and Therapeutics* 58, 319-79.

Caulfield, M. P., and Birdsall, N. J. M. (1998). International Union of Pharmacology. XVII Classification of muscarinic Acetylcholine Receptors. *Pharmacol. Rev.* 50, 279--290.

Chang, Y., and Weiss, D. S. (1998). Substitutions of the highly conserved M2 leucine create spontaneously opening rho1 gamma-aminobutyric acid receptors. *Mol Pharmacol* 53, 511-23.

Changeux, J. P. (1995). Thudichum Medal Lecture. The acetylcholine receptor: a model for allosteric membrane proteins. *Biochem Soc Trans* 23, 195-205.

Changeux, J. P. (1990). The TiPS lecture. The nicotinic acetylcholine receptor: an allosteric protein prototype of ligand-gated ion channels. *Trends Pharmacol Sci* 11, 485-92.

Changeux, J. P., Devillers-Thiery, A., and Chemouilli, P. (1984). Acetylcholine receptor: an allosteric protein. *Science* 225, 1335-45.

Chavez, R. A., and Hall, Z. W. (1992). Expression of fusion proteins of the nicotinic acetylcholine receptor from mammalian muscle identifies the membrane-spanning regions of the alpha subunit and delta subunit. *J. Cell Biol.* 116, 385-393.

Chavez, R. A., and Hall, Z. W. (1991). The transmembrane topology of the amino terminus of the alpha subunit of the nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 266, 15532-8.

Chavez-Noriega, L. E., Crona, J. H., Washburn, M. S., Urrutia, A., Elliott, K. J., and Johnson, E. C. (1997). Pharmacological characterization of recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors ha2ba, ha2b4, ha3b2, ha3b4, ha4b2, ha4b4 and ha7 expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280, 346-356.

Chen, C., LeBlanc, C., and Bobbin, R. P. (1996). Differences in cholinergic responses from outer hair cells of rat and guinea pig. *Hearing Research* 98, 9-17.

- Chen, J., and Auerbach, A. (1998). A distinct contribution of the delta subunit to acetylcholine receptor channel activation revealed by mutations of the M2 segment. *Biophys. J.* 75, 218-225.
- Choe, S., and Robinson, R. (1998). An ingenious filter: the structural basis for ion channel selectivity. *Neuron* 20, 821-823.
- Clarke, P. B. S. (1992). The fall and rise of neuronal alpha-bungarotoxin binding proteins. *TIPS* 13, 407-413.
- Claudio, T., Ballivet, M., Patrick, J., and Heinemann, S. (1983). Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Torpedo californica* acetylcholine receptor gamma subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 1111-5.
- Cohen, B. N., Labarca, C., Davidson, N., and A., L. H. (1992). Mutations in the M2 alter the selectivity of the mouse nicotinic acetylcholine receptor for organic and alkali metal cations. *J. Gen. physiol.* 100, 373-400.
- Colquhoun, L. M., and Patrick, J. W. (1997). Alpha3, beta2, and beta4 form heterotrimeric neuronal nicotinic acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *Journal of Neurochemistry* 69, 2355-62.
- Connor, E. A., Levy, S. M., and Parsons, R. L. (1983). Kinetic analysis of atropine-induced alterations in bullfrog ganglionic fast synaptic currents. *J. Physiol. (London)* 337, 137-158.
- Conroy, W. G., Vernallis, A. B., and Berg, D. K. (1992). The $\alpha 5$ gene product assembles with multiple acetylcholine receptor subunits to form distinctive receptor subtypes in brain. *Neuron* 9, 679-691.
- Cooper, E., Couturier, S., and Ballivet, M. (1991). Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature* 350, 235-8.
- Corringer, P., Galzi, J., Eisele, J., Bertrand, S., Changeux, J., and Bertrand, D. (1995). Identification of a new component of the agonist binding site of the nicotinic alpha 7 homooligomeric receptor. *J Biol Chem* 270, 11749-52.
- Couturier, S., Bertrand, D., Matter, J.-M., Hernandez, M.-C., Bertrand, S., Millar, N., Valera, S., Barkas, T., and Ballivet, M. (1990). A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit ($\alpha 7$) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by α -BTX. *Neuron* 5, 847-856.

Curtis, D. R., and Ryall, R. W. (1966). The acetylcholine receptors of Renshaw cells. *Exp. Brain Res.* 2, 66-80.

Czajkowski, C., DiPaola, M., Bodkin, M., Salazar--Jimenez, M., Holtzman, E., and Karlin, A. (1989). The intactness and orientation of acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo californica* electric tissue. *Arch. Biochem. Biophys.* 272, 412-420.

Czajowski, C., and Karlin, A. (1991). Agonist binding site of the *Torpedo* electric tissue nicotinic acetylcholine receptor. A negatively charged region of the delta subunit within 0.9 nm of the alpha subunit binding site disulfide. *J. Biol. Chem.* 266, 22603-22612.

Czajowski, C., Kaufman, C., and Karlin, A. (1993). Negatively charged amino acid residues in the nicotinic acetylcholine receptor delta subunit that contribute to the binding of acetylcholine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6285-6289.

Dale, H. (1914). The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 6, 147-190.

Dallos, P., Santos-Sacchi, J., and Flock, A. (1982). Intracellular recordings from cochlear outer hair cells. *Science* 218, 582-584.

Dani, J. A. (1989). Site-directed mutagenesis and single-channel currents define the ionic channel of the nicotinic acetylcholine receptor [news]. *Trends Neurosci* 12, 125-8.

Decker, E. R., and Dani, J. A. (1990). Calcium permeability of the nicotinic acetylcholine receptor: the single-channel calcium influx is significant. *J Neurosci* 10, 3413-20.

del Castillo, J., and Katz, B. (1957). Interaction at endplate receptors between different choline derivatives. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 146, 369-381.

Deneris, E. S., Conolly, J., Rogers, S. W., and Duvoisin, R. (1991). Pharmacological and functional diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *TIPS* 12, 34-40.

Dennis, M., Giraudat, J., Kotzyba-Hibert, F., Goeldner, M., Hirth, C., Chang, J. Y., Lazure, C., Chretien, M., and Changeux, J. P. (1988). Amino acids of the *torpedo marmorata* acetylcholine receptor α subunit labeled by a photoaffinity ligand for the acetylcholine binding site. *Biochem.* 27, 2346-2357.

Devillers-Thiéry, A., Galzi, J. L., Eiselé, J. L., Bertrand, S., Bertrand, D., and Changeux, J. P. (1993). Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor: a prototype of ligand-gated ion channels. *J. Membrane Biol.* 136, 97-112.

DiPaola, M., Czajkowski, C., and Karlin, A. (1989). The sidedness of the of the COOH terminus of the acetylcholine receptor delta subunit. *Biol. Chem.* 264, 15457-15463.

DiPaola, M., Kao, P. N., and Karlin, A. (1990). Mapping the alpha-subunit site photolabeled by the noncompetitive inhibitor [3H]quinacrine azide in the active state of the nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 265, 11017-29.

Doi, T., and Ohmori, H. (1993). Acetylcholine increases intracellular Ca²⁺ concentration and hyperpolarizes the guinea-pig outer hair cell. *Hear Res* 67, 179-88.

Dorje, F., Wess, J., Lambrecht, G., Tacke, R., Mutschler, E., and Brann, M. R. (1991). Antagonist binding profiles of five cloned human muscarinic receptor subtypes. *J. P. E. T.* 256, 727-733.

Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280, 69-76.

Dulon, D., and Lenoir, M. (1996). Cholinergic responses in developing outer hair cells of the rat cochlea. *European J. Neurosci* 8, 1945-1952.

Dulon, D., Luo, L., Zhang, C., and Ryan, A. F. (1998). Expression of small-conductance calcium-activated potassium channels (SK) in outer hair cells of the rat cochlea. *Eur J Neurosci* 10, 907-15.

Duvoisin, R. M., Deneris, E. S., Patrick, J., and Heinemann, S. (1989). The functional diversity of the neuronal nicotinic acetylcholine receptors is increased by a novel subunit: $\beta 4$. *Neuron* 3, 487-496.

Eatock, R. A., Rusch, A., Lysakowski, A., and Saeki, M. (1998). Hair cells in mammalian utricles. *Otolaryngol Head Neck Surg* 119, 172-81.

Eaton, M. J., Labarca, C., and Eterovic, V. A. (2000). M2 mutations of the nicotinic acetylcholine receptor increase the potency of the non-competitive inhibitor phencyclidine. *Journal of Neuroscience Research* 61, 44-51.

Eccles, J. C., Fatt, P., and Koketsu, K. (1954). Cholinergic and inhibitory synapsis in a pathway from motor axon collaterals to motoneurons. *J Physiol (London)* 392/26, 524-562.

Eccles, J. C., Katz, B., and Kuffler, S. W. (1941). Nature of the "end-plate potential" in curarized muscle. *J. Neurophysiol.* 4, 362-387.

Egebjerg, J., and Heinemann, S. F. (1992). Calcium permeability of unedited and edited versions of the kainate selective glutamate receptor GluR6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 755-759.

Eisele, J. L., Bertrand, S., Galzi, J. L., Devillers-Thiery, A., Changeux, J. P., and Bertrand, D. (1993). Chimaeric nicotinic-serotonergic receptor combines distinct ligand binding and channel specificities [see comments]. *Nature* 366, 479-83.

Elgoyhen, A. B., Johnson, D. S., Boulter, J., Vetter, D. E., and Heinemann, S. (1994). Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* 79, 705-15.

Elgoyhen, A. B., Vetter, D. E., Katz, E., Rothlin, C. V., Heinemann, S. F., and Boulter, J. (2001). alpha 10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc Natl. Acad. Sci.* 98, 3501-3506.

Eltze, M., König, H., Ullrich, B., and Grebe, T. (1997). Contraction of guinea-pig gallbladder: muscarinic M3 or M4 receptors? *European Journal Of Pharmacology* 332, 77-87.

England, P. M., Zhang, Y., Dougherty, D. A., and Lester, H. A. (1999). Backbone mutations in transmembrane domains of a ligand-gated ion channel: Implications for the mechanisms of gating. *Cell* 96, 89-98.

ErosteGUI, C., Nenov, A. P., Norris, C. H., and Bobbin, R. P. (1994). Acetylcholine activates a K⁺ conductance permeable to Cs⁺ in guinea pig outer hair cells. *Hear Res* 81, 119-29.

ErosteGUI, C., Norris, C. H., and Bobbin, R. P. (1994). In vitro pharmacologic characterization of a cholinergic receptor on outer hair cells. *Hearing Research* 74, 135-47.

Evans, M. G. (1996). Acetylcholine activates two currents in guinea-pig outer hair cells. *J Physiol (Lond)* 491, 563-78.

Eybalin, M. (1993). Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol. Rev.* 73, 309-373.

Fatt, P., and Katz, B. (1951). An analysis of the endplate potential recorded with an intra-cellular electrode. *J. Physiol. (London)* 115, 109-128.

Fetz, A., Large, W. A., and Trautmann, A. (1977). Analysis of atropine action at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol (London)* 269, 109-130.

Fex, J., and Altschuler, R. A. (1981). Enkephalin-like immunoreactivity of olivocochlear nerve fibers in cochlea of guinea pig and cat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 1255-1259.

Fieber, L. A., and Adams, D. J. (1991). Acetylcholine-evoked currents in cultured neurones dissociated from rat parasympathetic cardiac ganglia. *J Physiol (Lond)* 434, 215-37.

Filatov, G. N., and White, M. M. (1995). The role of conserved leucines in the M2 domain of the acetylcholine receptor in channel gating. *Mol. Pharmacol.* 48, 379-384.

Friedman, R. A., House, J. W., Luxford, W. M., Gherini, S., and Mills, D. (2000). Profound hearing loss associated with hydrocodone/acetaminophen abuse. *Am J* 21, 188-91.

Frings, S., Seifert, R., Godde, M., and Kaupp, U. B. (1995). Profoundly different calcium permeation and blockage determine the specific function of distinct cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* 15, 169-79.

Fuchs, P. A., and Murrow, B. W. (1992). Cholinergic inhibition of short (outer) hair cells of the chick's cochlea. *J. Neurosci.* 12, 800-809.

Fukuda, K., Kubo, T., Akiba, I., Maeda, A., Mishina, M., and Numa, S. (1987). Molecular distinction between muscarinic acetylcholine receptor subtypes. *Nature* 327, 623-625.

Galzi, J., Bertrand, D., Devillers-Thiery, A., Revah, F., Bertrand, S., and Changeux, J. (1991). Functional significance of aromatic amino acids from three peptide loops of the $\alpha 7$ neuronal nicotinic receptor site investigated by site directed mutagenesis. .

Galzi, J. L., Bertrand, S., Corringer, P. J., Changeux, J. P., and Bertrand, D. (1996). Identification of calcium binding sites that regulate potentiation of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Embo J* 15, 5824-32.

Galzi, J. L., Devillers-Thiery, A., Hussy, N., Bertrand, S., Changeux, J. P., and Bertrand, D. (1992). Mutations in the channel domain of a neuronal nicotinic receptor convert ion selectivity from cationic to anionic. *Nature* 359, 500-5.

Galzi, J. L., Edelstein, S. J., and Changeux, J. P. (1996). The multiple phenotypes of allosteric receptor mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 1853-1858.

Galzi, J.-L., Revah, F., Black, D., Goeldner, M., Hirth, C., and Changeux, J. P. (1990). Identification of a novel amino acid α -tyrosine 93 within the cholinergic ligand-binding sites of the acetylcholine receptor by photoaffinity labeling. *J. Biol. Chem.* 265, 10430-10437.

Gannong, W. F. (1999). Hearing & Equilibrium. In *Review of Medical Physiology* (Stamford: Appleton & Lange).

Gerzanich, V., Anand, R., and Lindstrom, J. (1994). Homomers of α 8 and α 7 subunits of nicotinic receptors exhibit similar channel but contrasting binding site properties. *Molec. Pharmacol.* 45, 212-220.

Gillespie, P. (1995). Molecular machinery of auditory and vestibular transduction. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5, 449-555.

Giraudat, J., Dennis, M., Heidmann, T., Chang, J.-Y., and Changeux, J.-P. (1986). Structure of the high affinity binding site for noncompetitive blockers of the acetylcholine receptor: serine 262 of the δ subunit is labeled by [3 H]chlorpromazine. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83, 2719-2723.

Giraudat, J., Dennis, M., Heidmann, T., Haumont, P.-Y., F., L., and Changeux, J.-P. (1987). Structure of the high affinity binding site for noncompetitive blockers of the acetylcholine receptor: [3 H]chlorpromazine labels homologous residues in the beta and delta chains. *Biochemistry* 26, 2410-2418.

Giraudat, J., Devillers-Thiery, A., Auffray, C., Rougeon, F., and Changeux, J. P. (1982). Identification of a cDNA clone coding for the acetylcholine binding subunit of *Torpedo marmorata* acetylcholine receptor. *Embo J*, 713-7.

Giraudat, J., Galzi, J.-L., Revah, F., Changeux, J.-P., Haumont, P.-Y., and Lederer, F. (1989). The noncompetitive blocker [3 H]chlorpromazine labels segment M2 but not segment M1 of the nicotinic acetylcholine receptor α -subunit. *FEBS Lett.* 253, 190-198.

Glowatzki, E., Wild, K., Brandle, U., Fakler, G., Fakler, B., Zenner, H. P., and Ruppersberg, J. P. (1995). Cell-specific expression of the alpha 9 n-ACh receptor subunit in auditory hair cells revealed by single-cell RT-PCR. *Proceedings of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences* 262, 141-147.

Goyal, R. K. (1988). Identification, localization and classification of muscarinic receptor subtypes in the gut. *Life Sciences* 43, 2209-20.

Grenningloh, E. H., Rienitz, A., Schmit, B., Methfessel, C., Zensen, M., Beyreuther, K., Gundelfinger, E. D., and Betz, H. (1987). The strychnine-binding subunit of the glycine receptor shows homology with nicotinic acetylcholine receptors. *Nature* 328, 215-220.

Guinan, J. J. (1996). Efferent Physiology. In *The Cochlea*, P. Dallos, A. N. Popper and R. R. Fay, eds. (New York: Springer), pp. 435-502.

Guinan, J. J., Warr, W. B., and Norris, B. E. (1983). Differential olivocochlear projections from lateral vs medial zones of the superior olivary complex. *J. Comp. Neurol.* 221, 358-370.

Gulya, K., Krivan, M., Nyolczas, N., Sarnyai, Z., and Kovacs, G. L. (1988). Central effects of the potent and highly selective mu opioid antagonist D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂ (CTOP) in mice. *Eur J Pharmacol* 150, 355-60.

Gulya, K., Lui, G. K., Pelton, J. T., Kazmierski, W., Hruby, V. J., and Yamamura, H. I. (1986). H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂: a potent and selective antagonist opioid receptors. *NIDA Res Monogr* 75, 209-12.

Gunthorpe, M. J., Peters, J. A., Gill, C. H., Lambert, J. J., and Lummis, S. C. (2000). The 4'lysine in the putative channel lining domain affects desensitization but not the single-channel conductance of recombinant homomeric 5-HT_{3A} receptors. *J* 522 Pt 2, 187-98.

Guth, P. S. (1996). The hair cell acetylcholine receptors: a synthesis. *Hearing Res.* 98, 1-8.

Guth, P. S., Norris, C. H., Guth, S. L., Quine, D. B., and Williams, W. H. (1986). Cholinomimetics mimic efferent effects on semicircular canal afferent activity in the frog. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 102, 194-203.

Guth, P. S., Perin, P., Norris, C. H., and Valli, P. (1998). The vestibular Hair Cells: Post-transductional signal processing. *Prog. Neurobiol.* 54, 193-247.

Haghighi, A. P., and Cooper, E. (2000). A molecular link between inward rectification and calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine $\alpha 3\beta 4$ and $\alpha 4\beta 2$ receptors. *J. Neurosci.* 20, 529-541.

Heller Brown, J., and Taylor, P. (1996). Muscarinic receptor agonists and antagonists. In Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, A. Goodman Gilman, J. G. Hardman and L. E. Limbird, eds. (New York: McGraw Hill), pp. 141-160.

Hiel, H., Elgoyhen, A., Drescher, D., and Morley, B. (1996). Expression of nicotinic acetylcholine receptor mRNA in the adult rat peripheral vestibular system. *Brain Res.* 738, 347-352.

Hiel, H., Elgoyhen, A. B., Drescher, D. G., and Morley, B. J. (1996). Expression of nicotinic acetylcholine receptor mRNA in the adult peripheral vestibular system. *Brain Res.* 738, 347-352.

Hiel, H., Luebke, A. E., and Fuchs, P. A. (2000). Cloning and expression of the $\alpha 9$ nicotinic acetylcholine receptor subunit in cochlear hair cells of the chick. *Brain Res.* 858, 215-225.

Hill, A. V. (1913). The combinations of Haemoglobin with oxygen and carbon monoxide. *Biochem. J.* 7, 471-480.

Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol. (London)* 117, 500-554.

Holley, M. (1996). Outer hair cell motility. In *The Cochlea*, Dallos, Popper and Fay, eds. (New York: Springer-Verlag), pp. 386-434.

Hollmann, M., Maron, C., and Heinemann, S. (1994). N-glycosylation site tagging suggests a three transmembrane domain topology for the glutamate receptor GluRI. *Neuron* 13, 1331-43.

Holt, J. C., Pantoja, A. M., Athas, G. B., and Guth, P. S. (2000). A role for chloride in the hyperpolarizing effect of acetylcholine in isolated frog vestibular hair cells. *Hear* 146, 17-27.

Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989). Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 77, 61-68.

Hosey, M. M. (1992). Diversity of structure, signaling and regulation within the family of muscarinic cholinergic receptors. *FASEB J* 6, 845-852.

- Housley, G. D., and Ashmore, J. F. (1991). Direct measurement of the action of acetylcholine on isolated outer hair cells of the guinea pig cochlea. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 244, 161-7.
- Housley, G. D., Norris, C. H., and Guth, P. S. (1989). Electrophysiological properties and morphology of hair cells isolated from the semicircular canal of the frog. *Hear. Res.* 38, 259-276.
- Hucho, F., Bandini, G., and Suarz-Isla, B. A. (1978). The acetylcholine receptor as part of a protein complex in receptor enriched membrane fragments from *Torpedo californica* electric tissue. *Eur. J. Biochem.* 83, 335-340.
- Hucho, F., and Changeux, J. P. (1973). Molecular mass and quaternary structure of the cholinergic receptor protein extracted by detergents from *Electrophorus electricus* electric tissue. *FEBS Lett.* 38, 11-15.
- Hucho, F., Oberthur, W., and Lottspeich, F. (1986). The ion channel of the nicotinic acetylcholine receptor is formed by the homologous helices M II of the receptor subunits. *FEBS Lett* 205, 137-42.
- Hucho, F., Tsetlin, V. I., and Machold, J. (1996). The emerging three-dimensional structure of a receptor - The nicotinic acetylcholine receptor. *European Journal of Biochemistry* 239, 539-557.
- Hume, R. I., Dingledine, R., and Heinemann, S. F. (1991). Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science* 253, 1028-1031.
- Hussy, N., Ballivet, M., and Bertrand, D. (1994). Agonist and antagonist effects of nicotine on chick neuronal nicotinic receptors are defined by a and b subunits. *J. Neurophysiol* 72, 1317-1326.
- Ifune, C. K., and Steinbach, J. H. (1991). Voltage-dependent block by magnesium of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channels in rat pheochromocytoma cells. *J Physiol (Lond)* 443, 683-701.
- Imoto, K., Busch, C., Sakmann, B., Mishina, M., Konno, T., Nakai, J., Bujo, H., Mori, Y., Fukuda, K., and Numa, S. (1988). Rings of negatively charged amino acids determine the acetylcholine receptor channel conductance. *Nature* 335, 645-648.
- Jahr, C. E., and Stevens, C. F. (1993). Calcium permeability of the N-methyl-D-aspartate receptor channel in hippocampal neurons in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11573-7.

Johnson, D., Martinez, J., Elgoyhen, A., Heinemann, S., and McIntosh, J. (1995). α -Conotoxin Im1 exhibits subtype-specific nicotinic acetylcholine receptor blockade: preferential inhibition of homomeric $\alpha 7$ and $\alpha 9$ receptors. *Molec. Pharmacol.* *48*, 194-199.

Kakehata, S., Nakagawa, T., Takasaka, T., and Akaike, N. (1993). Cellular mechanism of acetylcholine-induced response in dissociated outer hair cells of guinea-pig cochlea. *J. Physiol. (Lond.)* *463*, 227-244.

Kao, P. N., and Karlin, A. (1986). Acetylcholine receptor binding site contains a disulfide crosslink between adjacent half-cystinyl residues. *J. Biol. Chem.* *261*, 8085-8088.

Karlin, A. (1993). Structure of nicotinic acetylcholine receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* *3*, 299-309.

Karlin, A., and Akabas, M. H. (1995). Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. *Neuron* *15*, 1231-1244.

Katz, E., Verbitsky, M., Rothlin, C. V., Vetter, D. E., Heinemann, S. F., and Elgoyhen, A. B. (2000). High calcium permeability and calcium block of the $\alpha 9$ nicotinic acetylcholine receptor. *Hearing Res.* *141*, 117-128.

Klein, J., Koppen, A., Loffelholz, K., and Schmitthenner, J. (1992). Uptake and metabolism of choline by rat brain after acute choline administration. *J. Neurochem.* *58*, 870-876.

Kondo, H., Kuramoto, H., Wainer, B. H., and Yanaihara, N. (1985). Evidence for the coexistence of acetylcholine and enkephaline in the sympathetic preganglionic neurons in rats. *Brain Res.* *335*, 309-314.

Kong, W., Egg, G., Schrott-Fischer, A., and Hussl, B. (1997). Innervation of cholinergic vestibular efferent system in vestibular periphery of rats. *J Tongji Med Univ* *17*, 57-60, 64.

Kurosaki, T., Fukuda, K., and Numa, S. (1987). Functional properties of nicotinic acetylcholine receptor subunits expressed in various combinations. *FEBS Lett.* *214*, 253-258.

Labarca, C., Nowak, M. W., Zhang, H., Tang, L., Deshpande, P., and Lester, H. A. (1995). Channel gating governed symmetrically by conserved leucine residues in the M2 domain of nicotinic receptors. *Nature* *376*, 514-516.

Land, B. R., Salpeter, E. E., and Salpeter, M. M. (1981). Kinetic parameters for acetylcholine interaction in intact neuromuscular junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *78*, 7200-7204.

Langley, J. N. (1909). On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of 'receptive' substances. IV: The effect of curari and some other substances on the nicotine response of the sartorius and gastrocnemius muscles of the frog. *J Physiol* 39, 235.

Langley, J. N. (1878). On the physiology of salivary secretion. Part II. On the mutual antagonism of atropin and pilocarpin, having especial reference to their relations in the sub-maxillary gland of the cat. *J Physiol (London)* 1, 339-369.

Langley, J. N. (1905). On the reaction of cells and of nerve endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curare. *J Physiol (London)* 33, 374.

Lawlor, P., Marcotti, W., Rivolta, M. N., Kros, C. J., and Holley, M. C. (1999). Differentiation of mammalian vestibular hair cells from conditionally immortal, postnatal supporting cells. *Journal of Neuroscience* 19, 9445-58.

Leonard, R. J., Labarca, C. G., Charvet, P., Davidson, N., and Lester, H. (1988). Evidence that the M2 membrane-spanning region lines the ion channel of the nicotinic receptor. *Science* 242, 1578-1581.

Lieberman, M. C. (1980). Efferent synapses in the inner hair cell area of the cat cochlea: An electron microscopic study of serial sections. *Hearing Res.* 3, 189-204.

Liman, E. R., Tygat, J., and Hess, P. (1992). Subunit Stoichiometry of a Mammalian K⁺ Channel Determined by Construction of Multimeric cDNAs. *Neuron* 9, 861-871.

Lioudyno, M. I., Verbitsky, M., Glowatzki, E., Fuchs, P. A., Holt, C. J., Zadina, J. E., Elgoyhen, A. B., and Guth, P. S. (2001). The $\alpha 9\alpha 10$ -containing nicotinic receptor is directly modulated by opioid peptides, endomorphin-1 and dynorphin B. Manuscript in preparation.

Lioudyno, M. I., Verbitsky, M., Holt, J. C., Elgoyhen, A. B., and Guth, P. S. (2000). Morphine inhibits an $\alpha 9$ -acetylcholine nicotinic receptor-mediated response by a mechanism which does not involve opioid receptors. *Hear. Res.* 149, 167-177.

Listerud, M., Brussaard, A. B., Devay, P., Colman, D. R., and Role, L. W. (1991). Functional contribution of neuronal AChR subunits revealed by antisense oligonucleotides [published erratum appears in *Science* 1992 Jan 3;255(5040):12]. *Science* 254, 1518-21.

Luetje, C. W., and Patrick, J. (1991). Both alpha- and beta-subunits contribute to the agonist sensitivity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Neuroscience* 11, 837-45.

Luetje, C. W., Wada, K., Rogers, S., Abramson, S. N., Tsuji, K., Heinemann, S., and Patrick, J. (1990). Neurotoxins distinguish between different neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit combinations. *J Neurochem* 55, 632-40.

Lukas, R. J. (1989). Nicotinic acetylcholine receptor diversity: agonist binding and functional potency. *Prog. Brain Res.* 79, 117-127.

Luo, L., Bennett, T., Jung, H. H., and Ryan, A. F. (1998). Developmental expression of alpha 9 acetylcholine receptor mRNA in the rat cochlea and vestibular inner ear. *J Comp Neurol* 393, 320-31.

Lustig, L. R., Hiel, H., and Fuchs, P. A. (1999). Vestibular hair cells of the chick express the nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha 9. *J Vestib Res* 9, 359-67.

MacMillan, S. J., Mark, M. A., and Duggan, A. W. (1998). The release of beta-endorphin and the neuropeptide-receptor mismatch in the brain. *Brain Res.*, 127-136.

Maricq, A. V., Peterson, A. S., Brake, A. J., Myers, R. M., and Julius, D. (1991). Primary structure and functional expression of the 5HT3 receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* 254, 432-436.

McCleskey, E. W. (1994). Calcium channels: cellular roles and molecular mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 4, 304-12.

McCrea, P. D., Popot, J. L., and Engelman, D. L. (1987). Transmembrane topography of the nicotinic acetylcholine receptor delta subunit. *EMBO J.* 6, 3619-3626.

McNiven, A. I., Yuhas, W. A., and Fuchs, P. A. (1996). Ionic dependence and agonist preference of an acetylcholine receptor in hair cells. *Auditory Neurosci.* 2, 63-77.

Micheletti, R., and Schiavone, A. (1990). Functional determination of McN-A-343 affinity from M1 muscarinic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253, 310-314.

Middelton, R. E., and Cohen, J. B. (1991). Mapping of the acetylcholine binding site of the nicotinic acetylcholine receptor: [3H]nicotine as a photo affinity label. *Biochem.* 30, 6987-6997.

- Miledi, R., and Parker, I. (1984). Chloride current induced by injection of calcium into *Xenopus* oocytes. *J Physiol (Lond)* 357, 173-83.
- Mishina, M., Toshiyuki, T., Imoto, K., Noda, M., Takahashi, T., Numa, S., Methfessel, C., and Sakmann, B. (1986). Molecular distinction between fetal and adult forms of the muscle acetylcholine receptor. *Nature* 321, 406-411.
- Monod, J., Wyman, J., and Changeux, J. P. (1965). On the nature of allosteric transitions. *J. Mol. Biol.* 12, 88-118.
- Morales, M. A., Holmberg, K., Xu, Z. Q., Cozzari, C., Hartman, B. K., Emson, P., Goldstein, M., Elfvin, L. G., and Hokfelt, T. (1995). Localization of choline acetyltransferase in rat peripheral sympathetic neurons and its coexistence with nitric oxid synthase and neuropeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 11819-11823.
- Mori, H., Masaki, H., Yamakura, T., and Mishima, I. (1992). Identification by mutagenesis of a magnesium-block site of the NMDA receptor channel. *Nature* 358, 673-675.
- Morley, B. J., Li, H. S., Hiel, H., Drescher, D. G., and Elgoyhen, A. B. (1998). Identification of the subunits of the nicotinic cholinergic receptors in the rat cochlea using RT-PCR and in situ hybridization. *Brain Res Mol Brain Res* 53, 78-87.
- Mulle, C., Choquet, D., Korn, H., and Changeux, J. P. (1992). Calcium influx through nicotinic receptor in rat central neurons: its relevance to cellular regulation. *Neuron* 8, 135-43.
- Murray, N., Zheng, Y., Mandel, G., Brehm, P., Bolinger, R., Reuer, Q., and Kullberg, R. (1995). A single site on the epsilon subunit is responsible for the change in ACh receptor channel conductance during skeletal muscle development. *Neuron* 14, 865-70.
- Neher, E., and Sakmann, B. (1976). Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers. *Nature* 260, 799-802.
- Nenov, A. P., Chen, C., and Bobbin, R. P. (1998). Outward rectifying potassium currents are the dominant voltage activated currents present in Deiters' cells. *Hear Res* 123, 168-82.
- Nenov, A. P., Norris, C., and Bobbin, R. P. (1996). Acetylcholine response in guinea pig outer hair cells. I. Properties of the response. *Hear Res* 101, 132-48.

Nenov, A. P., Norris, C., and Bobbin, R. P. (1996). Acetylcholine response in guinea pig outer hair cells. II. Activation of a small conductance Ca(2+)-activated K⁺ channel. *Hearing Research* 101, 149-72.

Nieder, P., and Nieder, I. (1970). Antimasking effect of crossed olivocochlear bundle stimulation with loud clicks in guinea pig. *Exp. Neurol.* 28, 179-188.

Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Furutani, Y., Hirose, T., Asai, M., Inayama, S., Miyata, T., and Numa, S. (1982). Primary structure of alpha-subunit precursor of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence. *Nature* 299, 793-7.

Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Kikuyotani, S., Furutani, Y., Hirose, T., Takashima, H., Inayama, S., Miyata, T., and Numa, S. (1983). Structural homology of *Torpedo californica* acetylcholine receptor subunits. *Nature* 302, 528-32.

Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Kikuyotani, S., Hirose, T., Asai, M., Takashima, H., Inayama, S., Miyata, T., and Numa, S. (1983). Primary structures of beta- and delta-subunit precursors of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequences. *Nature* 301, 251-5.

Norris, C. H., Housley, G. D., Williams, W. H., Guth, S. L., and Guth, P. S. (1988). The acetylcholine receptors of the semicircular canal of the frog (*Rana Pipiens*). *Hear. Res.* 32, 197-206.

Nutter, T., and Adams, D. (1995). Monovalent and divalent cation permeability and block of neuronal nicotinic receptor channels in rat parasympathetic ganglia. *J Gen Physiol* 105, 701-23.

Oatman, L. C. (1976). Effects of visual attention on the intensity of auditory evoked potentials. *Exp. Neurol.* 51, 41-53.

Ohtani, M., Devau, G., Lehouelleur, J., and Sans, A. (1994). Cholinergic agonists increase intracellular calcium concentration in frog vestibular hair cells. *Hear Res* 80, 167-73.

O'Leary, M. E., Filatov, G. N., and White, M. M. (1994). Characterization of d-tubocurarine binding site of *Torpedo* acetylcholine receptor. *Am. J. Physiol.* 266, C648-c653.

Oliver, D., Klocker, N., Schuck, J., Baukowitz, T., Ruppertsberg, J. P., and Fakler, B. (2000). Gating of Ca²⁺-activated K⁺ channels controls fast inhibitory synaptic transmission at auditory outer hair cells. *Neuron* 26, 595-601.

Palma, E., Bertrand, S., Binzoni, T., and Bertrand, D. (1996). Neuronal nicotinic alpha 7 receptor expressed in *Xenopus* oocytes presents five putative binding sites for methyllycaconitine. *Journal of Physiology - London* 497, 151-161.

Palma, E., Miledi, A. M., Eusebi, F., and Miledi, R. (1996). Threonine-for-leucine mutation within domain M2 of the neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptor converts 5-hydroxytryptamine from antagonist to agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11231-11235.

Papke, R. L., Bencherif, M., and Lippiello, P. (1996). An evaluation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation by quaternary nitrogen compounds indicates that choline is selective for the $\alpha 7$ subtype. *Neurosci. Letters* 213, 201-204.

Papke, R. L., and Heinemann, S. F. (1994). Partial agonist properties of cytisine on neuronal nicotinic receptors containing the beta 2 subunit. *Molecular Pharmacology* 45, 142-9.

Papke, R. L., and Thinschmidt, J. S. (1998). The correction of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor concentration-response relationships in *Xenopus* oocytes. *Neuroscience Letters* 256
<http://www.biomednet.com/db/medline/99071007>, 163-6.

Park, H. J., Niedzielski, A. S., and Wenthold, R. J. (1997). Expression of the nicotinic acetylcholine receptor subunit, alpha9, in the guinea pig cochlea. *Hear Res* 112, 95-105.

Paton, W. D. M., and Rang, H. P. (1965). The uptake of atropine and related drugs by intestinal smooth muscle of the guinea pig in relation to acetylcholine receptors. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 163, 121-165.

Patuzzi, R. (1996). Cochlear micromechanics and macromechanics. In *The cochlea*, P. Dallos, A. N. Popper and R. R. Fay, eds. (New York: Springer-Verlag), pp. 44-129.

Patuzzi, R. B., Yates, G. K., and Johnstone, B. M. (1989). Outer hair receptor currents and sensorineural hearing loss. *Hearing Res.* 42, 47-72.

Pedersen, S. E., Brigman, P. C., Sharp, S. D., and Cohen, J. B. (1990). Identification of a cytoplasmic region of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit by epitope mapping. *J. Biol. Chem.* 265, 569-581.

Pedersen, S. E., Sharp, S. D., Liu, W. S., and Cohen, J. B. (1992). Structure of the noncompetitive antagonist binding site of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor. [3H]meproadifen mustard reacts selectively with alpha subunit Glu-262. *J. Biol. Chem.* 267, 10489-10499.

Perin, P., Holt, J. C., Guth, P. S., and Norris, C. H. (1998). A comparison of the cholinergic properties of the leopard frog vestibular organs. *Primary Sensory Neuron* 2, 275-282.

Poulter, L., Earnest, J. P., Stroud, R. M., and Burlingame, A. L. (1989). Structure, oligosaccharide structures, and posttranslationally modified sites of the nicotinic acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 6645-6649.

Puchacz, E., Buisson, B., Bertrand, D., and Lukas, R. J. (1994). Functional expression of nicotinic acetylcholine receptors containing rat alpha 7 subunits in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *FEBS Let.* 354, 155-159.

Rafferty, M. A., Hunkapiller, M. W., Strader, C. D., and Hood, L. E. (1980). Acetylcholine receptor: complex of homologous subunits. *Science* 208, 1454-1457.

Ragozzino, D., Barabino, B., Fucile, S., and Eusebi, F. (1998). Ca²⁺ permeability of mouse and chick nicotinic acetylcholine receptors expressed in transiently transfected human cells. *J Physiol (Lond)* 507, 749-57.

Rajan, R. (1988). Effect of electrical stimulation of the crossed olivocochlear bundle on temporary threshold shifts in auditory sensitivity. I Dependence on electrical stimulation parameters. *J. Neurophysiol.* 60, 549-568.

Ramirez-Latorre, J., Yu, C., Qu, X., Perin, F., Karlin, A., and Role, L. (1996). Functional contributions of alpha 5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels. *Nature* 380, 347-351.

Ramirez-Latorre, J., Yu, C. R., Qu, X., Perin, F., Karlin, A., and Role, L. (1996). Functional contributions of alpha5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels. *Nature* 380, 347-51.

Rathouz, M. M., and Berg, D. K. (1994). Synaptic-type acetylcholine receptors raise intracellular calcium levels in neurons by two mechanisms. *J Neurosci* 14, 6935-45.

Reitstetter, R., Lukas, R. J., and Gruener, R. (1999). Dependence of nicotinic acetylcholine receptor recovery from desensitization on the duration of agonist exposure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289, 656-660.

Revah, F., Bertrand, D., Galzi, J. L., Devillers-Thiery, A., Mulle, C., Hussy, N., Bertrand, S., Ballivet, M., and Changeux, J. P. (1991). Mutations in the channel domain alter desensitization of a neuronal nicotinic receptor. *Nature* 353, 846-9.

Revah, F., Galzi, J. L., Giraudat, J., Haumont, P. Y., Lederer, F., and Changeux, J. P. (1990). The noncompetitive blocker [3H]chlorpromazine labels three amino acids of the acetylcholine receptor gamma subunit: implications for the alpha- helical organization of regions MII and for the structure of the ion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4675-9.

Richards, M. (1991). Pharmacology and second messenger interactions of cloned muscarinic receptors. *Biochem. Pharmacol.* 42, 1645-1653.

Rogers, M., and Dani, J. A. (1995). Comparison of quantitative calcium flux through NMDA, ATP, and ACh receptor channels. *Biophys J* 68, 501-6.

Role, L. W. Diveristy in primary structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2, 254-262

Rothlin, C. V., Katz, E., Verbitsky, M., and Elgoyhen, A. B. (1999). The $\alpha 9$ nicotinic acetylcholine receptor shares pharmacological properties with type A γ -aminobutyric acid, glycine and type 3 serotonin receptors. *Molecular Pharmacology* 55, 248-254.

Ryan, A. F., Simmons, D. M., Watts, A. G., and Swanson, L. W. (1991). Enkephalin mRNA production by cochlear and vestibular efferent neurons in the gerbil brainstem. *Exp. Brain Res.* 87, 259--267.

Sands, S. B., and Barish, M. E. (1991). Calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channels in PC12 cells. *Brain Res* 560, 38-42.

Sands, S. B., and Barish, M. E. (1992). Neuronal nicotinic acetylcholine receptor currents in phaeochromocytoma (PC12) cells: dual mechanisms of rectification. *J Physiol (Lond)* 447, 467-87.

Sankararamkrishnan, R., and Samsom, M. (1994). Kinked structures of isolated nicotinic receptor M2 helices: a molecular dynamics study. *Biopolymers* 34, 1647-57.

Sargent, P. B. (1993). The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 70, 403-443.

Schneggenburger, R. (1996). Simultaneous measurement of Ca²⁺ influx and reversal potentials in recombinant N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Biophys J* 70, 2165-74.

Schoepfer, R., Conroy, W. G., Whiting, P., Gore, M., and Lindstrom, J. (1990). Brain α -bungarotoxin binding protein cDNAs and Mabs reveal subtypes of this branch of the ligand-gated ion channel gene superfamily. *Neuron* 5, 35-48.

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

Schofield, P. R., Darlison, M. G., Fujita, N., Burt, D. R., Stephenson, F. A., Rodriguez, H., Rhee, L. M., Ramachandran, J., Reale, V., Glencorse, T. A., and al., e. (1987). Sequence and functional expression of the GABA A receptor shows a ligand-gated receptor super family. *Nature* 328, 221-227.

Séguéla, 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.

Sine, S. M., Claudio, T., and Sigworth, F. J. (1990). Activation of Torpedo acetylcholine receptors expressed in mouse fibroblasts. Single channel current kinetics reveal distinct agonist binding affinities. *J Gen Physiol* 96, 395-437.

Sine, S. M., and Steinbach, J. H. (1984). Agonists block currents through acetylcholine receptor channels. *Biophys. J.* 46, 277-284.

Slepecky, N. B. (1996). Structure of the mammalian cochlea. In *The cochlea*, P. Dallos, A. N. Popper and R. R. Fay, eds. (New York: Springer-Verlag), pp. 44-129.

Stefano, G. B., Goumon, Y., Casares, F., Cadet, P., Fricchione, G. L., Rialas, C., Peter, D., Sonetti, D., Guarna, M., Ingeborg, D., Bianchi, W., and Bianchi, E. (2000). Endogenous morphine. *TINS* 23, 436-441.

Stephenson, R. P. (1956). A modification of receptor theory. *Br. J. Pharmacol.* 11, 379-393.

Strecker, A., Franke, P., Weise, C., and Hucho, F. (1994). All potential glycosylation sites of the nicotinic acetylcholine receptor delta-subunit from *Torpedo californica* are utilized. *Eur. J. Biochem.* 220, 1005-1011.

Sugai, Y. J., Sugitani, M., and Ooyama, H. (1992). Actions of cholinergic agonist and antagonists on the efferent synapse in frog sacculus. *Hear. Res.* *61*, 56-64.

Takeuchi, A., and Takeuchi, N. (1960). On the permeability of the endplate membrane during the action of transmitter. *J. Physiol. (London)* *154*, 52-67.

Unwin, N. (1995). Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature* *373*, 37-43.

Unwin, N. (1993). Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *J Mol Biol* *229*, 1101-24.

Unwin, N. (1998). The nicotinic acetylcholine receptor of the Torpedo electric ray. *J Struct Biol* *121*, 181-90.

Unwin, N. (1996). Projection structure of the nicotinic acetylcholine receptor: distinct conformations of the α subunits. *J.Mol. Biol.*

Verbitsky, M., Rothlin, C., Katz, E., and Elgoyhen, A. B. (2000). Mixed nicotinic-muscarinic properties of the $\alpha 9$ nicotinic receptor. *Neuropharmacology in press*.

Vernallis, A. B., Conroy, W. G., and Berg, D. K. (1993). Neurons assemble acetylcholine receptors with as many as three kinds of subunits while maintaining subunit segregation among receptor subtypes. *Neuron* *10*, 451-454.

Vernino, S., Amador, M., Luetje, C. W., Patrick, J., and Dani, J. A. (1992). Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron* *8*, 127-34.

Vernino, S., Rogers, M., Radcliffe, K. A., and Dani, J. A. (1994). Quantitative measurement of calcium flux through muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* *14*, 5514-24.

Vetter, D. E., Liberman, M. C., Mann, J., Barhanin, J., Boulter, J., Brown, M. C., Saffioti-Kolman, S., Heinemann, S. F., and Elgoyhen, A. B. (1999). Role of $\alpha 9$ nicotinic ACh receptor subunits in the development and function of cochlear efferent innervation. *Neuron* *23*, 93-103.

Villarroel, A., Herlitze, S., Koenen, M., and Sakmann, B. (1991). Location of a threonine residue in the α -subunit M2 transmembrane segment that determines the ion flow through the acetylcholine receptor channel. *Proc. R. Soc. Lond. (B)* *243*, 69-74.

- Ward, J. M., Cockcroft, V. B., Lunt, G. G., Smillie, F. S., and Wonnacott (1990). Methyllycaconitine: selective probe for neuronal α -bungarotoxin binding sites. *FEBS Letters* 270, 45-48.
- Weiss, T. (1982). Bidirectional transduction in vertebrate hair cells: a mechanism for coupling mechanical and electrical processes. *Hearing Res.* 7, 353-360.
- Wess, J. (1993). Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function. *Trends in Pharmacological Sciences* 14, 308-13.
- Wheeler, S. V., Chad, J. E., and Foreman, R. (1993). Residues 1 to 80 of the N-terminal domain of the β subunit confer neuronal bungarotoxin sensitivity and agonist selectivity on neuronal nicotinic receptors. *FEBS Letters* 332, 139-142.
- White, B. H., and Cohen, J. B. (1992). Agonist-induced changes in the structure of the acetylcholine receptor M2 regions revealed by photoincorporation of an uncharged nicotinic noncompetitive antagonist. *J. Biol. Chem.* 267, 15770-15783.
- Whiting, P., and Lindstrom, J. (1987). Purification and characterization of a nicotinic acetylcholine receptor from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 595-9.
- Whiting, P., Schoepfer, R., Lindstrom, J., and Priestley, T. (1991). Structural and pharmacological characterization of the major brain nicotinic acetylcholine receptor subtype stably expressed in mouse fibroblasts. *Mol Pharmacol* 40, 463-72.
- Whiting, P., Schoepfer, R., Swanson, L., Simmons, D., and Lindstrom, J. (1987). Functional acetylcholine receptor in PC12 cells reacts with a monoclonal antibody to brain nicotinic receptors. *Nature* 327, 515-8.
- Wiederhold, M. L., and Kiang, N. Y. S. (1970). Effects of electrical stimulation of the crossed olivocochlear bundle on cat single auditory nerve fibres. *J. Acoust. Soc. Amer.* 48, 950-965.
- Wilson, G. G., and Karlin, A. (1998). The location of the gate in the acetylcholine receptor channel. *Neuron* 20
<http://biomednet.com/db/medline/98318245>, 1269-81.

Witzemann, V., Stein, E., Barg, B., Konno, T., Koenen, M., Kues, W., Criado, M., Hofmann, M., and Sakmann, B. (1990). Primary structure and functional expression of the alpha-, beta-, gamma-, delta- and epsilon-subunits of the acetylcholine receptor from rat muscle. *Eur J Biochem* 194, 437-48.

Wollmuth, L. P., Kuner, T., and Sakman, B. (1998). Adjacent asparagines in the NR2-subunit of the NMDA receptor channel control the voltage-dependent block by extracellular magnesium. *J. Physiol.* 506.1, 13-32.

Wollmuth, L. P., Kuner, T., Seeburg, P. H., and Sakmann, B. (1996). Differential contribution of the NR1- and NR2A-subunits to the selectivity filter of recombinant NMDA receptor channels. *J. Physiol.* 491.3, 779-797.

Yakel, J. L., Lagrutta, A., Adelman, J. P., and North, R. A. (1993). Single amino acid substitution affects desensitization of the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5030-3.

Yang, J., Elinor, P. T., Sather, W. A., Zhang, J.-F., and Tsien, R. W. (1993). Molecular determinants of calcium selectivity and ion permeation in L-type calcium channels. *Nature* 366, 158-161.

Zeng, F. Y., and Wess, J. (1999). Identification and molecular characterization of m3 muscarinic receptor dimers. *J Biol Chem* 274, 19487-97.

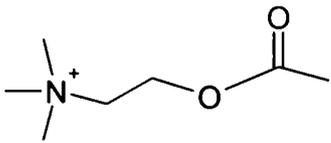
Zhang, Z.-W., Vijayaraghavan, S., and Berg, D. (1994). Neuronal acetylcholine receptors that bind a-bungarotoxin with high affinity function as ligand-gated ion channels. *Neuron* 12, 167-177.

Zuo, J., Treadaway, J., Buckner, T. W., and Fritzsich, B. (1999). Visualization of alpha9 acetylcholine receptor expression in hair cells of transgenic mice containing a modified bacterial artificial chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 14100-5.

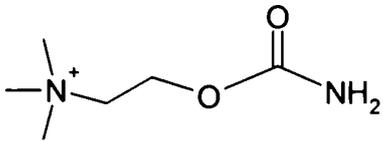
Zwart, R., and Vijverberg, H. P. M. (2000). Potentiation and inhibition of neuronal $\alpha 4\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptors by choline. *Eur. J. Pharmacol.* 393, 209-214.

Zwart, R., and Vijverberg, H. P. M. (1997). Potentiation and inhibition of neuronal nicotinic receptors by atropine: competitive and non-competitive effects. *Mol. Pharmacol.* 52, 886-895.

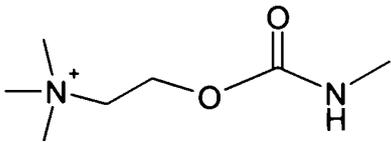
APENDICE: Estructuras de los compuestos colinérgicos, nicotínicos y muscarínicos utilizados



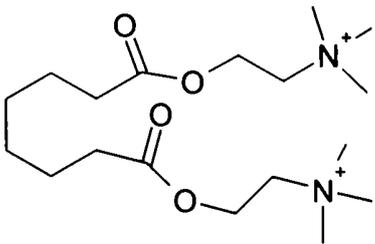
ACh



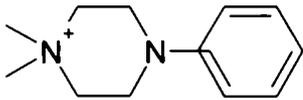
Carbacol



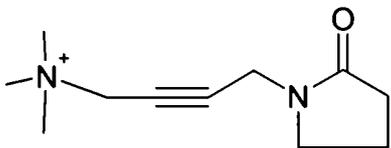
Metilcarbacol



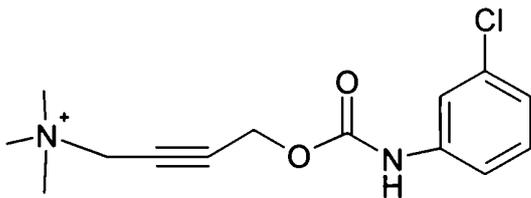
Suberildicolina



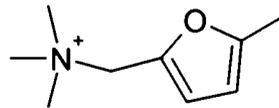
DMPP



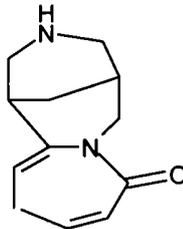
Oxotremorina-M



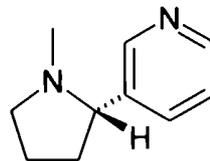
McN-A-343



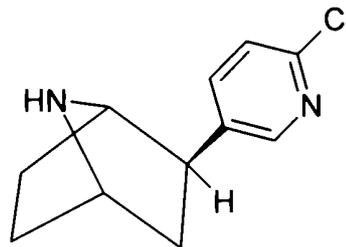
Metilfurtretonio



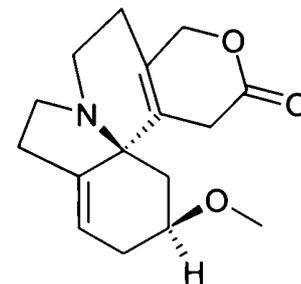
Citisina



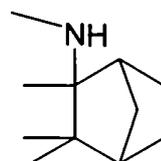
Nicotina



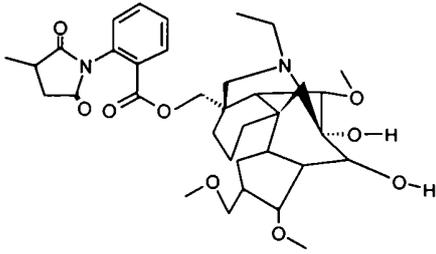
Epibatidina



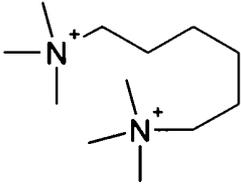
DHβE



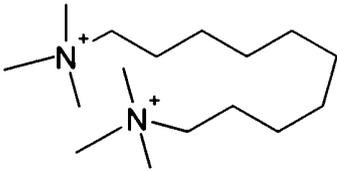
Mecamilamina



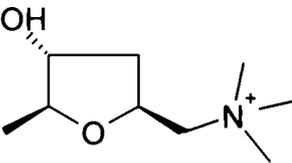
MLA



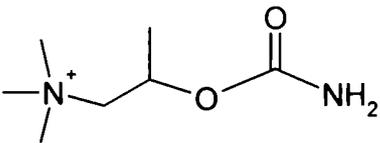
Hexametonio



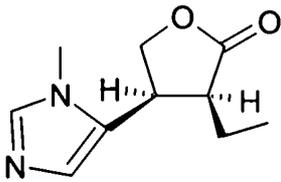
Decametonio



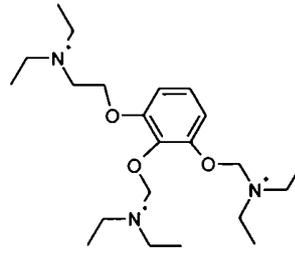
Muscarina



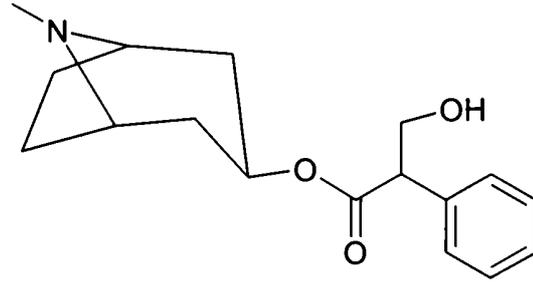
Betanecol



Pilocarpina



Galamina



Atropina

Ana
 Ana Beteu' ELGOYHEN