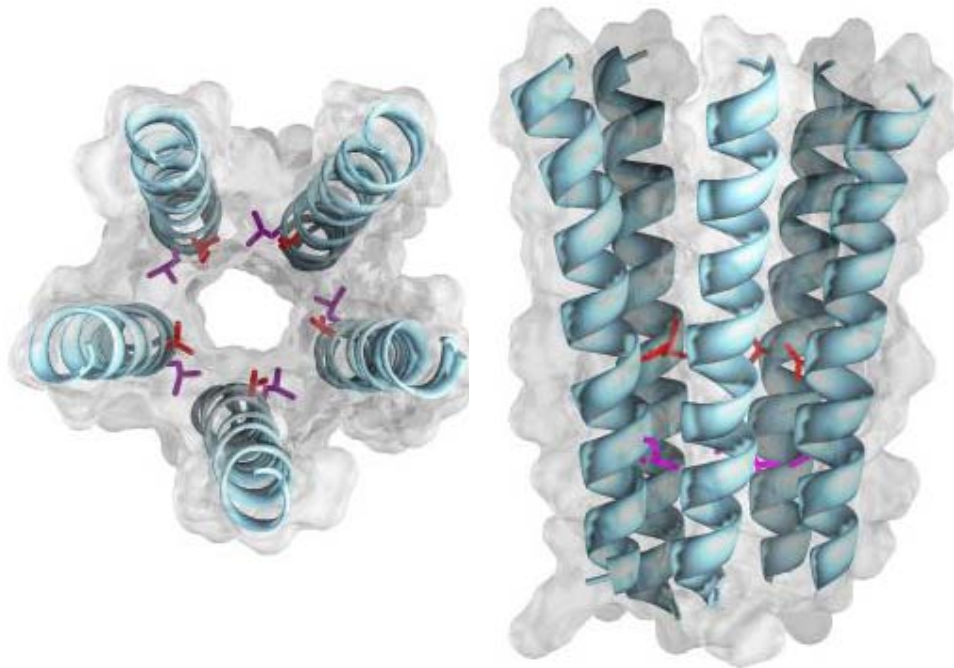


**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESTUDIO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA -  
FUNCIÓN DEL RECEPTOR COLINÉRGICO  
NICOTÍNICO  $\alpha 9\alpha 10$**

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires



Autor:

Director de tesis:

Consejero de estudios:

Lugar de trabajo:

Bioq. Paola Viviana Plazas

Dra. Ana Belén Elgoyhen

Dr. Marcelo Rubinstein

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y  
Biología Molecular, INGEBI, UBA-CONICET.

Buenos Aires, diciembre de 2005

*A MI MADRE*

*A PATO*

*A LA MEMORIA DE MI VIEJO Y GUCHA*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A la Dra. Elgoyhen, por haber confiado en mí brindándome la oportunidad de unirme a su grupo, por permitirme trabajar con libertad, por guiarme e incentivar me durante mi formación científica.*

*A la Dra. Katz, por su permanente apoyo y ayuda, por su calidez.*

*A mis queridos y entrañables compañeros de laboratorio. Por los buenos momentos compartidos y por el apoyo en aquellos momentos difíciles que me ha tocado vivir. Por hacer del laboratorio un lugar donde los valores humanos son una prioridad. Por transformar, cada uno con su esencia, el lugar de trabajo en un ámbito familiar:*

*“La” Caro y “la” Maru, con su frescura “del interior”, sus ríos de mate y anécdotas delirantes*

*Pomata, con su bondad, su compañerismo “todo terreno” y su fiebre “dúlcera”*

*Guchi, con su dialecto inentendible, sus berrinches y su generosidad*

*Gastón, con su locura histriónica, humor y ternura*

*Noe y Ana, con su verborragia infinita*

*Jime, con su calidez y ayuda permanente*

*Julián y Santi, con su sed “revolucionaria”, sus ganas de cambiar las cosas*

*Vivi, con su sonrisa contagiosa y sus regalitos sorpresa*

*Jessi, con su “data” precisa, su sencillez*

*Marce, Javi y Ceci, con sus ganas de aprender y ayudar*

*Gracias a todos ellos el camino recorrido tiene una doble recompensa.*

*A Migue y a Carla, por guiarme durante mis primeros pasos electrofisiológicos.*

*A Dani Calvo, por las charlas compartidas, por sus consejos gastronómicos, musicales y cinematográficos.*

*A la Dra. Bouzat, por adoptarme como miembro de su laboratorio durante varias semanas y brindarme su interés y apoyo en la dolorosa empresa de tratar de registrar los “canalitos” del receptor  $\alpha 9 \alpha 10$ . A María José, quien se inmoló juntó a mí frente al set up, y nunca bajó los brazos, y al resto del laboratorio, por alentarme permanentemente.*

*Al Dr. Torres y a la Dra. Flawia, y en su nombre a todo el INGEBI, por darme un lugar donde desarrollar mi tesis.*

*Al CONICET, por haber destinado recursos para mi formación científica.*

*A mi madre, por su ejemplo de lucha, compromiso y honestidad. Por irradiar con energía y ganas de disfrutar la vida, a todos los que la rodeamos. Por su apoyo incondicional y permanente interés en este trabajo.*

*A mis padres, por todo el esfuerzo realizado en brindarme una educación integral. Por alentarme permanentemente, por criarme en un ámbito cuyos pilares fueron la libertad, el respeto y la confianza.*

*A Flor, por estar ahí, siempre cerca.*

*A Pato, mi compañero de ruta. Por su interés en esta tesis, por ser un permanente motor de ideas, por bancarme en los momentos de incertidumbre, por quererme, cuidarme y alentarme en todos los proyectos que he encarado. Esta tesis es también suya.*

Parte de los resultados de esta tesis fueron publicados en:

Plazas, PV, De Rosa, MJ, Gomez-Casati, ME, Verbitsky, M, Weisstaub, N, Katz, E, Bouzat, C, Elgoyhen, AB. (2005) Key roles of hydrophobic rings of TM2 in gating of the  $\alpha 9\alpha 10$  nicotinic cholinergic receptor. *Br. J. Pharmacol.* **145**:963-74.

McIntosh, JM, Plazas, PV, Watkins, M, Gomez-Casati, ME, Olivera, BM, Elgoyhen, AB. (2005) A Novel  $\alpha$ -Conotoxin, PeIA, cloned from *Conus pergrandis*, discriminates between rat  $\alpha 9\alpha 10$  and  $\alpha 7$  nicotinic cholinergic receptors. *J. Biol. Chem.* **280**: 30107-30112.

## ABREVIATURAS

5-HT: 5-hidroxitriptamina, serotonina

5-HT<sub>3A</sub>: subunidad tipo 3A del receptor de serotonina

α-CTx: alfa-conotoxina

Å: amstrong

ACh: acetilcolina

AChBP: proteína unidora de acetilcolina

ADN: ácido deoxirribonucleico

ADNc: ácido deoxirribonucleico copia

ARN: ácido ribonucleico

ARNc: ácido ribonucleico copia

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

C: cisteína

CCE: células ciliadas externas

CCI: células ciliadas internas

CCR: curva de concentración respuesta

CE<sub>50</sub>: concentración efectiva para lograr el 50% de la respuesta

Ch: colina

CI<sub>50</sub>: concentración efectiva para el lograr el 50% de la inhibición

D: ácido aspártico

DMPP: 1,1-dimetil-4-fenilpiperazinio

E: ácido glutámico

Erev: potencial de reversión aparente

et al.: *Et alter* (y otros)

GABA: ácido γ-aminobutírico

HEPES: N-(2-hidroxiethyl)piperazina-N'ácido-(2-etansulfónico)

I: corriente

Ileu: isoleucina

ICS 205,930: tropisetron

k<sub>D</sub>: constante de disociación

Leu: leucina

MΩ: megaohmio

TM2: dominio transmembranal 2

min.: minutos

nH: coeficiente de Hill

mV: milivoltios

nA, μA: nano y microamperios

nAChR: receptor colinérgico nicotínico

nl, μl: nano y microlitros

nM, μM, mM: nano, micro y milimoles por litro

NMG: N-metil-D-glucamina

Phe: fenilalanina

s: segundos

SEM: error estándar de la media

SCAM: estudios de rastreo por accesibilidad de cisteínas

SNA: Sistema Nervioso Autónomo

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Sistema Nervioso Periférico

Strych: estriquina

T: treonina

Thr: treonina

V: voltaje

Val: valina

W: triptofano

WT: salvaje

Y: tirosina

# ESTUDIO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA- FUNCIÓN DEL RECEPTOR COLINÉRGICO NICOTÍNICO $\alpha 9\alpha 10$

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo ha sido estudiar alguno de los aspectos de la relación estructura-función del receptor colinérgico nicotínico (nAChR)  $\alpha 9\alpha 10$ .

En la primera parte, analizamos el papel que juegan tres anillos de residuos hidrofóbicos (17', 13' y 9') del dominio transmembranal dos (TM2) en la función de dicho receptor. Para ello, realizamos un estudio sistemático de mutagénesis de estos tres residuos a treonina y comparamos las propiedades de los receptores mutantes expresados en oocitos de *Xenopus laevis*. Los cambios fenotípicos de los receptores mutantes incluyeron: una disminución de la tasa de desensibilización, una disminución de la  $CE_{50}$  para ACh, un aumento de la eficacia a agonistas parciales, y una reducción de la modulación alostérica por  $Ca^{2+}$  extracelular. Los receptores mutantes exhibieron aperturas espontáneas y, al nivel de canal único, un incremento del tiempo medio aparente del estado abierto sin cambios en la conductancia, sugiriendo que el mecanismo que subyace a estos cambios es un aumento en el *gating* del canal. En todos los casos los cambios fenotípicos fueron más drásticos para la mutación del residuo 13', ubicado en la mitad del TM2. Teniendo en cuenta el modelo atómico del poro del canal del órgano eléctrico de la raya *Torpedo*, proponemos que las interacciones de las cadenas laterales de los residuos 13' son las que juegan un papel clave en la creación de una barrera energética al paso de los iones.

En la segunda parte, tratamos de determinar la estequiometría del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  mediante el empleo de la mutagénesis dirigida de un residuo de valina del TM2 (V13') a treonina. La coexpresión, en oocitos de *Xenopus laevis*, de subunidades salvajes y mutantes de cada clase (por ejemplo,  $\alpha 9$  y  $\alpha 9V13'T$ ) con su contraparte salvaje (por ejemplo,  $\alpha 10$ ), resultó en poblaciones mixtas de receptores con diferentes sensibilidades por la ACh. Esto es consistente con la interpretación de que la mutación V13'T aumenta la sensibilidad a ACh en proporción al número de subunidades mutadas incorporadas al receptor. El número aparente de subunidades de cada clase incorporadas al receptor pudo ser deducido del número de componentes que comprende la curva de concentración–respuesta para ACh. Nuestros resultados sugieren que el nAChR recombinante  $\alpha 9\alpha 10$  es un pentámero compuesto por 2 subunidades  $\alpha 9$  y tres  $\alpha 10$ .

En la tercer parte, reportamos la caracterización funcional de una nueva toxina, la  $\alpha$ -conotoxina PeIA ( $\alpha$ -CTx PeIA), la cual discrimina entre los nAChRs sensibles a la  $\alpha$ -bungarotoxina  $\alpha 9\alpha 10$  y  $\alpha 7$ . La  $\alpha$ -CTx PeIA, presentó una sensibilidad 260 veces mayor por los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  ( $CI_{50}$ ,  $6.9 \pm 0.5$  nM) que por los receptores  $\alpha 7$  ( $CI_{50}$ ,  $1.8 \pm 0.1$   $\mu$ M). A pesar de que la  $\alpha$ -CTx PeIA presenta una alta homología con la  $\alpha$ -CTx MII y la  $\alpha$ -CTx GIC, a concentraciones de 10 $\mu$ M, ninguna de ellas bloqueó las respuestas a ACh del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$ . Entre los receptores neuronales no sensibles a  $\alpha$ -bungarotoxina, la toxina fue activa sobre los nAChRs  $\alpha 3\beta 2$ . De esta manera, la  $\alpha$ -CTx PeIA resultaría una herramienta útil para diferenciar las respuestas mediadas por los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  o  $\alpha 7$  en aquellos tejidos donde ambos receptores se expresan.

Palabras clave: canales iónicos, acetilcolina, receptores con asa de cisteínas, receptores nicotínicos, gatillado del canal, estequiometría,  $\alpha$ -conotoxinas.



## STUDY OF THE STRUCTURE –FUNCTION RELATIONSHIP OF THE NICOTINIC CHOLINERGIC RECEPTOR $\alpha 9\alpha 10$ .

### ABSTRACT

The aim of the present work was to study some aspects of the structure–function relationship of the nicotinic cholinergic receptor (nAChR)  $\alpha 9\alpha 10$ .

In the first part, we study the role of three hydrophobic rings of residues (17', 13' and 9') within transmembrane region two (TM2) in the receptor function. We have performed systematic mutagenesis of these three residues to threonine and compared the properties of mutant receptors reconstituted in *Xenopus laevis* oocytes. Phenotypic changes in mutant receptors were evidenced by a decrease in the desensitization rate, a decrease in the  $EC_{50}$  for ACh, an increase in the efficacy of partial agonists and a reduction of the allosteric modulation by extracellular  $Ca^{2+}$ . Mutant receptors exhibited spontaneous openings and, at the single-channel level, an increased apparent mean open time with no major changes in channel conductance, thus suggesting an increase in gating of the channel as the underlying mechanism. Overall, the degree of the phenotypes of mutant receptors was more overt in the case of the centrally located V13'T mutant. Based on the atomic model of the pore of the electric organ of the *Torpedo* ray, we propose that the interactions of side chains at positions 13' are key ones in creating an energetic barrier to ion permeation.

In the second part, we probed the stoichiometry of the  $\alpha 9\alpha 10$  nAChR by site-directed mutagenesis of a conserved valine of the TM2 domain (V13') to threonine. Co-expression of wild type and mutant subunits of each class (e.g.  $\alpha 9$  and  $\alpha 9V13'T$ ), along with their wild type counterpart (e.g.  $\alpha 10$ ), in *Xenopus* oocytes, resulted in mixed populations of receptors with distinct acetylcholine sensitivities. This is consistent with the interpretation that the V13'T mutation increased the ACh sensitivity in proportion to the number of incorporated mutant subunits. The apparent number of incorporated mutant subunits for each class could then be determined from the number of components comprising the compound acetylcholine concentration-response relationships. Our results suggest that the recombinant  $\alpha 9\alpha 10$  nAChR is a pentamer composed of two  $\alpha 9$  and three  $\alpha 10$  subunits.

In the third part, we report the functional characterization of a novel toxin,  $\alpha$ -conotoxin PeIA ( $\alpha$ -CTx PeIA), which discriminates between  $\alpha 9\alpha 10$  and  $\alpha 7$  nAChRs.  $\alpha$ -CTx PeIA displayed a 260-fold higher selectivity for  $\alpha$ -bungarotoxin-sensitive  $\alpha 9\alpha 10$  ( $IC_{50}$ ,  $6.9 \pm 0.5$  nM) nAChRs compared to  $\alpha$ -bungarotoxin-sensitive  $\alpha 7$  receptors ( $IC_{50}$ ,  $1.8 \pm 0.1$   $\mu$ M). Despite of the fact that  $\alpha$ -CTx PeIA bears high resemblance to  $\alpha$ -CTx MII and  $\alpha$ -CTx GIC, at concentrations of 10 $\mu$ M, none of them blocked acetylcholine responses in the  $\alpha 9\alpha 10$  nAChR. Among neuronal non- $\alpha$ -bungarotoxin sensitive receptors, the toxin was also active at  $\alpha 3\beta 2$  receptors.  $\alpha$ -CTx PeIA represents a novel probe to differentiate responses mediated either through  $\alpha 9\alpha 10$  or  $\alpha 7$  nAChRs in those tissues where both receptors are expressed.

Key words: ion channels, acetylcholine, cys-loop receptors, nicotinic receptors, channel gating, stoichiometry,  $\alpha$ -conotoxins.

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS COLINÉRGICOS</b>	<b>4</b>
GENES	4
EL RECEPTOR NICOTÍNICO MUSCULAR	6
ESTRUCTURA Y TOPOLOGÍA	7
ARQUITECTURA MOLECULAR	8
Los vestíbulos	10
El poro	11
La proteína unidora de acetilcolina	13
El dominio de unión a ACh	14
EL MECANISMO DE ACTIVACIÓN	15
EL RECEPTOR NICOTÍNICO: UNA PROTEÍNA CON TRANSICIONES ALOSTÉRICAS	19
LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS NEURONALES	21
GENES	21
PROPIEDADES GENERALES	22
PROPIEDADES BIOFÍSICAS	23
Ión calcio	23
Conductancia de canal único	24
Rectificación entrante	24
LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS NEURONALES NATIVOS: SU PAPEL FISIOLÓGICO	24
Sistema Nervioso Central	25
Sistema Nervioso Periférico	25
Ganglios autonómicos	25
El oído interno	25
EL RECEPTOR NICOTÍNICO COLINÉRGICO DE LAS CÉLULAS CILIADAS DEL OÍDO INTERNO	27
LA CÓCLEA	27
LA INERVACIÓN EFERENTE DE LAS CÉLULAS CILIADAS EXTERNAS DE LA CÓCLEA	27

LA IDENTIDAD MOLECULAR DEL RECEPTOR COLINÉRGICO DE LAS CÉLULAS CILIADAS EXTERNAS	28
<b>OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>33</b>
GENERACIÓN DE LOS RECEPTORES MUTANTES	33
EXPRESIÓN DE RECEPTORES RECOMBINANTES EN OOCITOS DE <i>XENOPUS LAEVIS</i> Y REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS	34
PRODUCCIÓN DE ARN <sub>c</sub>	34
OBTENCIÓN Y MANUTENCIÓN DE LOS OOCITOS. PROCEDIMIENTOS GENERALES PARA LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LOS RECEPTORES RECOMBINANTES Y REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO	34
CURVAS DE CONCENTRACIÓN – RESPUESTA	35
CURVAS DE INHIBICIÓN	36
CURVAS DE CORRIENTE – POTENCIAL	36
EVALUACIÓN DE LA PERMEABILIDAD AL CA <sup>2+</sup>	37
REGISTROS DE CANAL ÚNICO	38
DROGAS UTILIZADAS	39
<b>PARTE I</b>	<b>40</b>
LA COMPUERTA DEL nAChR $\alpha 9\alpha 10$ : EL PAPEL DE LOS ANILLOS DE RESIDUOS HIDROFÓBICOS DEL DOMINIO TRANSMEMBRANAL M2	40
INTRODUCCIÓN	41
RESULTADOS	44
Los receptores mutantes exhiben una disminución en sus cinéticas de desensibilización y un incremento en sus afinidades aparentes por ACh	44
La modulación alostérica mediada por el ion Ca <sup>2+</sup> extracelular se encuentra reducida en los receptores mutantes	46
La permeabilidad al Ca <sup>2+</sup> extracelular no se encuentra modificada en los receptores mutantes	50
La colina, un agonista parcial del receptor salvaje, se comporta como agonista total de los receptores mutantes	52

Algunos antagonistas clásicos del receptor salvaje son agonistas de los receptores mutantes	53
Los receptores mutantes exhiben aperturas espontáneas	54
Los registros de canal único revelan un incremento en el tiempo medio aparente del estado abierto de los receptores mutantes	56
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>60</b>
Los anillos de residuos hidrofóbicos ubicados en la zona central del dominio M2 están involucrados en el <i>gating</i> y posiblemente en la formación de la compuerta del receptor nicotínico $\alpha 9\alpha 10$	60
Los registros de canal único de receptores $\alpha 9\alpha 10$ salvaje y mutantes	63
Comparación con otros miembros de la familia de receptores con asa de cisteínas	64
<b>PARTE II</b>	<b>67</b>
DETERMINACIÓN DE LA ESTEQUIOMETRÍA DEL nAChR RECOMBINANTE $\alpha 9\alpha 10$	67
INTRODUCCIÓN	68
RESULTADOS	72
Coexpresión de las subunidades $\alpha 9$ , $\alpha 9V13'T$ y $\alpha 10$	72
Coexpresión de las subunidades $\alpha 9$ , $\alpha 10$ y $\alpha 10V13'T$	73
La estequiometría del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ es $(\alpha 9)_2(\alpha 10)_3$	74
La estequiometría del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ no depende de la disponibilidad relativa de las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$	80
DISCUSIÓN	81
<b>PARTE III</b>	<b>84</b>
CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE UNA $\alpha$ -CONOTOXINA QUE DISCRIMINA ENTRE LOS nAChRS $\alpha 9\alpha 10$ Y $\alpha 7$	84
INTRODUCCIÓN	85
Las conotoxinas	85
Conotoxinas que actúan sobre los receptores musculares	87
Conotoxinas que actúan sobre los receptores neuronales	87
Clonado de la $\alpha$ -conotoxina PeIA de <i>Conus pergandis</i>	87

RESULTADOS	89
La $\alpha$ -CTx PeIA discrimina entre los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ y $\alpha 7$	89
El bloqueo de $\alpha$ -CTx PeIA sobre los receptores $\alpha 9\alpha 10$ es reversible	90
Evaluación del efecto de $\alpha$ -CTx PeIA sobre los nAChRs neuronales insensibles a la $\alpha$ -bungarotoxina	90
La $\alpha$ -CTx PeIA es selectiva para los nAChRs	91
Las $\alpha$ -CTx MII y $\alpha$ -CTx GIC no tienen efecto sobre el receptor $\alpha 9\alpha 10$	92
DISCUSIÓN	94
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>98</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>99</b>

## **INTRODUCCIÓN**

Las sinápsis rápidas son estructuras complejas altamente especializadas: funcionan en el rango temporal de los milisegundos y espacial de los submicrometros. Las nanomaquinarias presentes en la pre- y post-sinapsis trabajan con una eficiencia muy elevada. Recién a mitad de los años 1950 se pudo establecer que la mayoría de las sinapsis no son uniones eléctricas simples sino que involucran intermediarios químicos.

La transmisión sináptica química es el proceso funcional que media la comunicación neurona-neurona y neurona-músculo o célula efectora. En su forma más simple, puede reducirse a dos pasos principales: 1- la liberación del neurotransmisor desde el terminal pre-sináptico y 2- la difusión del mismo a través de la brecha sináptica y posterior unión a receptores específicos presentes en las membranas pre- y post- sinápticas. La naturaleza, magnitud y signo de la respuesta de una neurona a un neurotransmisor dado están determinados por los tipos de receptores presentes en su membrana plasmática. La naturaleza de esta respuesta puede involucrar la apertura directa de un canal iónico (receptores ionotrópicos) o la regulación de la concentración de metabolitos intracelulares (receptores metabotrópicos).

Henry Dale, quien en 1914 aisló la acetilcolina (ACh) y clasificó a sus efectos en "tipo nicotina" y "tipo muscarina" (Dale, 1914), 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 su papel como transmisor químico del impulso nervioso.

Los receptores de ACh o colinérgicos se clasifican, según sus propiedades farmacológicas, en nicotínicos y muscarínicos (Dale, 1914; Taylor, 1990). Dichos receptores difieren en su estructura molecular y pertenecen a dos familias génicas distintas.

Los receptores muscarínicos, también llamados receptores colinérgicos metabotrópicos, pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G. Estos receptores están formados por una única cadena polipeptídica con siete pasos transmembranales (Hosey, 1992). Se encuentran principalmente en células efectoras de la división autonómica del sistema nervioso periférico, ganglios y cerebro.

Los receptores nicotínicos (nAChRs), también llamados receptores colinérgicos

ionotrópicos, pertenecen a la gran familia de canales iónicos activados por ligando, que también incluye a los receptores de glicina, de ácido  $\gamma$ -amino-butírico tipo A (GABA<sub>A</sub>) y tipo C (GABA<sub>C</sub>), de serotonina tipo 3 (5HT<sub>3</sub>) y también algunos de invertebrados. Los receptores nicotínicos se encuentran tanto en la placa neuromuscular como en el sistema nervioso central y periférico de los mamíferos. En la placa neuromuscular y en el sistema nervioso autónomo median la transmisión colinérgica excitatoria rápida a nivel sináptico. A nivel central, en cambio, estos receptores tienen localización principalmente pre-sináptica modulando la liberación de otros neurotransmisores (Jones et al., 1999).

En los años 1940 y 1950, Fatt y Katz (1951) sugirieron y luego Takeuchi y Takeuchi (1960) 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 los campos experimental y teórico. En el experimental, con la aparición de nuevas técnicas como la de radioligandos (Paton y Rang, 1965) y la medición de corrientes a través de un solo canal en parches de membrana (Neher y Sakmann, 1976). En el ámbito teórico, con la diferenciación conceptual entre la unión del agonista y la apertura y el cierre del canal, y la elaboración de un modelo para el estudio de los canales - receptores desarrollado por Monod, Wyman y Changeux (Changeux, 1990b; Changeux et al., 1984; Monod et al., 1965).

En los años 1980 el clonado de genes que codifican para subunidades de la familia de receptores colinérgicos nicotínicos significó un gran avance en el estudio de dichos receptores y de la neurotransmisión colinérgica. Las primeras subunidades en ser clonadas fueron las del receptor del órgano eléctrico de la raya *Torpedo* (Ballivet et al., 1982; Claudio et al., 1983; Giraudat et al., 1982; Noda et al., 1982; Noda et al., 1983), a las que le siguieron las subunidades del receptor muscular de roedores (Boulter et al., 1986; Boulter et al., 1985; Witzemann et al., 1990), y luego las subunidades nicotínicas neuronales. En 1994, Elgoyhen y colaboradores clonaron la subunidad nicotínica  $\alpha 9$  (Elgoyhen et al., 1994) y en 2001, la subunidad nicotínica  $\alpha 10$  (Elgoyhen et al., 2001), lo que permitió comenzar a dilucidar la identidad molecular del receptor colinérgico de las células ciliadas del oído interno. Este receptor es uno de los pocos ejemplos, junto con los receptores de la placa neuromuscular, el de las células de Renshaw de la médula espinal y el del ganglio

autonómico, en los que ha sido claramente demostrado el papel de un receptor colinérgico en la transmisión sináptica rápida (Oliver et al., 2000). El trabajo que aquí se presenta trata del estudio de la relación estructura - función del receptor colinérgico constituido por las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$ . En particular se estudiará el papel de tres residuos hidrofóbicos del segundo paso transmembranal en el mecanismo de acople entre la unión del agonista y la apertura del canal (*gating*), se tratará de determinar la estequiometría de subunidades que lo constituyen y se realizará la caracterización funcional de una  $\alpha$ -conotoxina que actúa selectivamente sobre dicho receptor.



## LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS COLINÉRGICOS

Los nAChRs son canales iónicos permeables a cationes, activados por el neurotransmisor acetilcolina. Son responsables de la transmisión de los impulsos nerviosos desde los nervios motores hacia las fibras musculares (receptores tipo muscular) y en los ganglios del sistema nervioso periférico (SNP) (receptores tipo neuronal). Se encuentran también en el sistema nervioso central (SNC) en donde se presume que son responsables de la adicción a nicotina, pero poco se conoce aún de la función fisiológica que allí desempeñan.

Estudios recientes tanto en el campo estructural como en el análisis electrofisiológico al nivel de canal único, han comenzado a echar luz sobre el papel que determinados residuos de aminoácidos juegan en los eventos moleculares que van desde la unión del agonista hasta la apertura del canal (*gating*).

### GENES

Todos los nAChRs son oligómeros compuestos por un anillo de cinco subunidades dispuestas alrededor del paso iónico (poro). Los genes que codifican para las subunidades de mamíferos hasta hoy conocidas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

	Ubicación cromosómica en el genoma humano (OMIM)	Nº de aminoácidos (incluyendo el péptido señal)	Nombre del gen	Nombre de Swiss-Prot y nº de acceso	
<b>subunidades musculares</b>					
<b>α1</b>	2q24-q32	457*	<i>CHRNA1</i>	ACHA_HUMAN - P02708 *	*isoforma 1
<b>β1</b>	17p12-p11	501	<i>CHRNB</i>	ACHB_HUMAN - P11230	
<b>γ</b>	2q33-q34	517	<i>CHRNG</i>	ACHG_HUMAN - P07510	Embrionario
<b>δ</b>	2q33-q34	517	<i>CHRND</i>	ACHD_HUMAN - Q07001	
<b>ε</b>	17p13-p12	493	<i>CHRNE</i>	ACHE_HUMAN	adulto
<b>subunidades neuronales</b>					
<b>α2</b>	8p21	529	<i>CHRNA2</i>	ACH2_HUMAN - Q15822	
<b>α3</b>	15q24	503	<i>CHRNA3</i>	ACH3_HUMAN - P32297	
<b>α4</b>	20q13.2-q13.3	627	<i>CHRNA4</i>	ACH4_HUMAN - P43681	
<b>α5</b>	15q24	468	<i>CHRNA5</i>	ACH5_HUMAN - P30532	

<b><math>\alpha 6</math></b>		494	<i>CHRNA6</i>	ACH6_HUMAN Q15825	
<b><math>\alpha 7</math></b>	15q14	502	<i>CHRNA7</i>	ACH7_HUMAN P36544	el gen humano está parcialmente duplicado en la misma región cromosómica
<b><math>\alpha 9</math></b>		479	<i>CHRNA9</i>	ACH9_HUMAN P43144	
<b><math>\alpha 10</math></b>	11p15.5	450	<i>CHRNA10</i>	ACH10_HUMAN Q9GZZ6	
<b><math>\beta 2</math></b>	1p21	502	<i>CHRNB2</i>	ACHN_HUMAN P17787	
<b><math>\beta 3</math></b>	8p11.2	458	<i>CHRNB3</i>	ACHO_HUMAN Q05901	
<b><math>\beta 4</math></b>	15q24	498	<i>CHRNB4</i>	ACHP_HUMAN P30926	

\*se conoce una variante de splicing con 25 amino ácidos adicionales (isoforma 2): la cual no forma canales funcionales.

## EL RECEPTOR NICOTÍNICO MUSCULAR

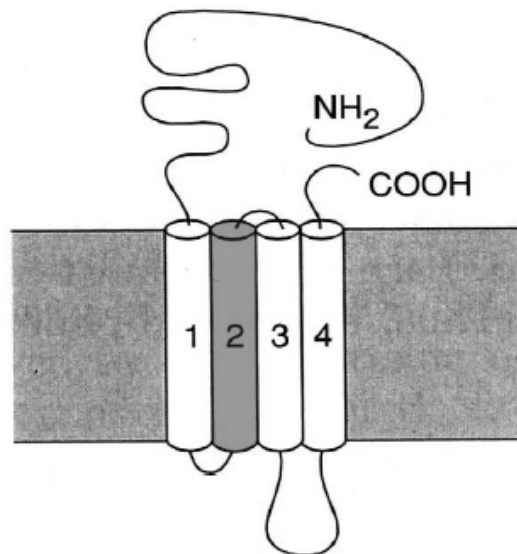
El nAChR muscular ha sido extensamente estudiado debido principalmente a que en el órgano eléctrico de la raya *Torpedo* se encuentra en gran abundancia un receptor muy similar. Un alto porcentaje de la superficie del órgano eléctrico está ocupada por la membrana post-sináptica que contiene arreglos parcialmente cristalinos de nAChRs densamente empaquetados. Ello ha permitido la purificación, secuenciación parcial de las subunidades y el clonado de los genes que las codifican

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

A partir de las membranas post-sinápticas aisladas se han obtenido estructuras cristalinas tubulares de receptores de *Torpedo* y se las ha utilizado para estudios de estructura – función por microscopía electrónica (Miyazawa et al., 2003; Miyazawa, 1999).

## ESTRUCTURA Y TOPOLOGÍA

El nAChR muscular es un complejo glicoprotéico de ~290 kDa, el cual consiste en cinco subunidades dispuestas alrededor del poro del canal. Las subunidades nicotínicas son similares en su secuencia de aminoácidos y presentan la misma topología (Figura 1): cada subunidad comprende un gran dominio N-terminal extracelular, cuatro dominios transmembranales (TM1-TM4), un gran lazo citoplasmático entre TM3 y TM4 y un dominio C-terminal extracelular.



**Figura 1** Diagrama de la topología de una subunidad de nAChR. Cada subunidad cruza la membrana cuatro veces.

Estas características son compartidas con subunidades que forman otros canales iónicos activados por ligando y con las que constituyen una superfamilia denominada *receptores de asa de cisteínas*, ya que contienen en el extremo N-terminal dos cisteínas, separadas por 13 aminoácidos, unidas por un puente disulfuro. Todos los miembros de esta superfamilia funcionan como canales iónicos, catiónico o aniónico, mediando la transmisión sináptica rápida excitatoria o inhibitoria. En

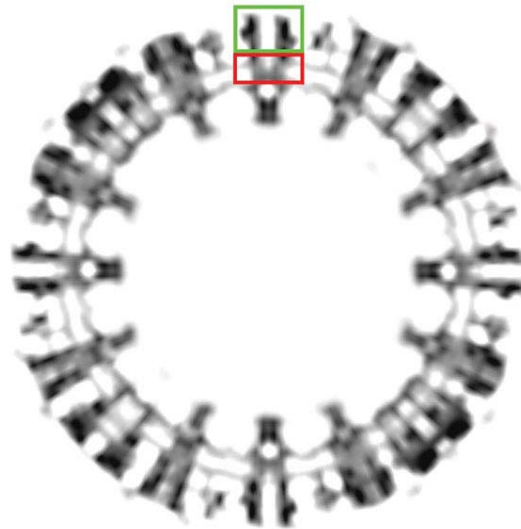
mamíferos, los miembros de esta superfamilia que son selectivos para cationes incluyen a los receptores nicotínicos y serotoninérgicos tipo 3, mientras que los que son selectivos para aniones incluyen a los receptores GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>C</sub> y glicinérgicos. En invertebrados, también existen canales iónicos miembros de esta superfamilia: estos canales son activados por glutamato, serotonina, histidina y acetilcolina (Raymond, 2002).

El receptor muscular tiene la siguiente composición: ( $\alpha 1$ )<sub>2</sub>,  $\beta 1$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  en músculo embrionario, pero en el adulto la subunidad  $\epsilon$  es reemplazada por una  $\delta$ . El órgano eléctrico de *Torpedo* contiene sólo la forma embrionaria. Las propiedades e interacciones entre subunidades han sido estudiadas exhaustivamente por técnicas bioquímicas, electrofisiológicas y de biología molecular (Corringer, 2000; Karlin, 2002). El orden de las subunidades alrededor del poro parecería ser:  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , en sentido horario y vistas desde la brecha sináptica. La apertura del canal ocurre tras la unión de la ACh a las dos subunidades  $\alpha$  en sitios cercanos o en las interfaces con las subunidades  $\delta$  y  $\gamma$  vecinas (Karlin, 1993; Sine, 1995; Xie, 2001). Estos sitios están conformados por tres regiones de la cadena polipeptídica y que incluyen al denominado asa de cisteínas (Corringer, 2000).

## ARQUITECTURA MOLECULAR

Los cristales tubulares de *Torpedo* han sido usados para casi todos los estudios tridimensionales del receptor entero (Kistler, 1981; Miyazawa, 1999), y consisten en dímeros de receptor altamente empaquetados, embebidos en sus lípidos nativos (Brisson, 1984). Se obtienen a partir de membranas post-sinápticas aisladas, las cuales conservan una curvatura similar a la que presentan *in vivo*.

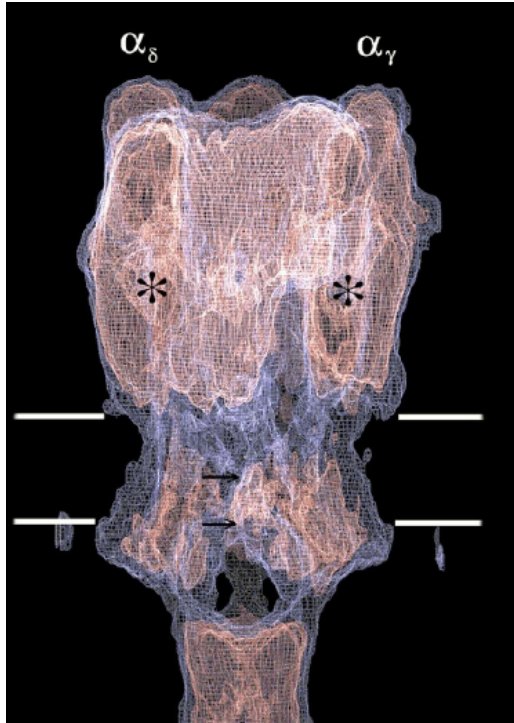
Los túbulos embebidos en hielo han sido estudiados por microscopía electrónica (Toyoshima, 1990). A baja resolución, el nAChR aparece como un cilindro de 70Å de diámetro  $\times$  160 Å de longitud compuesto por cinco subunidades de forma tubular dispuestas alrededor del eje central y alineadas perpendiculares al plano de la membrana. El paso iónico, definido por el eje de simetría, aparece como un poro estrecho a lo largo de la membrana, flanqueado por dos grandes vestíbulos (~20Å de diámetro).



**Figura 2** Corte transversal de un cristal tubular, a baja resolución. La proteína receptora se proyecta desde ambos lados de la membrana, vista como dos anillos concéntricos de densidad. La región transmembranal está delimitada por el cuadrado inferior y el dominio de unión N-terminal por el superior.

El posterior desarrollo de esta técnica ha llevado a resoluciones de  $9\text{\AA}$  (Unwin, 1993), y más recientemente, de  $4.6\text{\AA}$  (Miyazawa, 1999).

La Figura 3 muestra la apariencia del receptor nicotínico a una resolución de  $4.6\text{\AA}$ . En la porción extracelular las subunidades forman una pared pentagonal alrededor del eje central y generan un vestíbulo externo cilíndrico ( $20\text{\AA}$  de ancho  $\times$   $65\text{\AA}$  de longitud). A mitad de camino de esta porción se encuentran los sitios de unión de ACh (asteriscos). En la porción citoplasmática las subunidades forman un cono pentagonal invertido, el cual se estrecha hacia la base del receptor, generando un vestíbulo interno esférico ( $20\text{\AA}$  de diámetro). Los únicos contactos acuosos entre el vestíbulo interno y el interior celular son unas “ventanas” estrechas ubicadas entre las subunidades justo por debajo de la superficie de la membrana. La compuerta del canal, constituida por residuos de los segmentos M2, está cerca de la mitad de la membrana (flecha superior), y la zona de mayor constricción del canal en su estado abierto se encuentra más hacia la superficie citoplasmática de la membrana (flecha inferior).



**Figura 3** Arquitectura del nAChR entero. Se indican las posiciones de las dos subunidades  $\alpha$ , de los sitios de unión de ACh (asteriscos), de la compuerta del canal (flecha superior) y de la zona más estrecha del canal abierto (flecha inferior).

### Los vestíbulos

El papel fisiológico de los vestíbulos es, muy posiblemente, el de servir de filtro de pre-selección iónica. Haciendo uso de los grupos cargados ubicados en su boca y paredes internas, concentrarían los iones seleccionados y descartarían los iones discriminados. De esa forma, el entorno iónico podría ser modificado cerca del poro, aumentando la eficiencia de transporte de los iones permeantes e incrementando la selectividad, a partir de la interacción directa de los iones con residuos y/o grupos del esqueleto hidrocarbonado que dan a la zona de constricción. Una forma más directa de incrementar la conductancia iónica se podría lograr con anillos de cargas negativas localizados en la boca del poro. Existen evidencias que estos anillos (en las posiciones - 4', 1' y 20' del dominio TM2, usando el sistema de numeración definido en la Figura 4) juegan un papel importante en la conductancia del canal (Imoto et al., 1988).

En concordancia con el papel de “seleccionador”, la forma cilíndrica y el radio de  $\sim 10\text{\AA}$  del vestíbulo extracelular provee una ruta que es lo suficientemente estrecha para que los grupos cargados de las paredes internas influyan sobre los iones ubicados

en el centro del poro, pero no lo suficiente como para restringir su difusión.

El vestíbulo interno presenta una arquitectura diferente al extracelular, pero presumiblemente juegue un papel similar concentrando los iones, ya que experimentos electrofisiológicos en el nAChR muscular han mostrado que no hay una marcada preferencia de los iones de difundir en una u otra dirección a través de la membrana.

Por otro lado, la gran proporción de masa que da forma a los vestíbulos, también cumple otros propósitos como: formar los bolsillos de unión de la ACh, proveer sitios de unión de moléculas regulatorias y otras proteínas (rapsina) que se encuentran en las sinápsis.

## **El poro**

La región del receptor que constituye el canal propiamente dicho tiene tres funciones: mitigar la barrera de energía libre para permitir la traslocación de los iones a través de la membrana citoplasmática, seleccionar los iones permeantes y sufrir cambios conformacionales que determinan la apertura o el cierre del canal (Sakmann, 1992).

Las estructuras de las regiones transmembranales del receptor no han sido resueltas aún por métodos estructurales directos. Sin embargo, los segmentos que dan al poro han sido evidenciados como anillos de cinco densidades con forma cilíndrica, consistentes con una conformación  $\alpha$ -hélice. Estas hélices corresponderían a los dominios TM2, los cuales han sido determinados por marcación química (Hucho et al., 1986) (Giraudat et al., 1986) y por estudios de mutación sitio dirigida y electrofisiología (Imoto et al., 1988; Imoto, 1986; Leonard et al., 1988) como formadores de las paredes del poro. En el estado cerrado, el canal presenta estas hélices curvadas hacia el eje central, generando una zona de constricción del lumen hacia la mitad del poro. Esta zona es la más estrecha de todo el paso iónico, por lo que se presume que correspondería a la compuerta del canal.

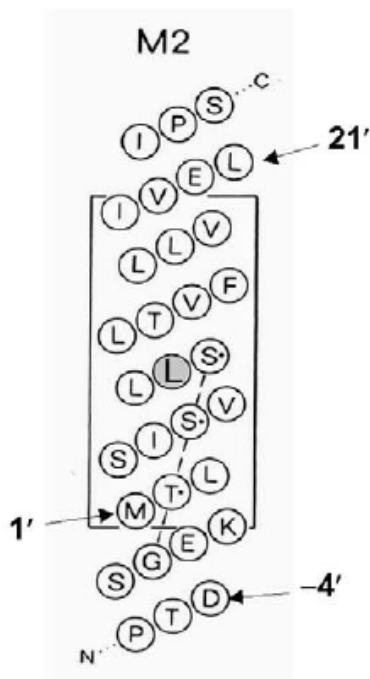
De esta forma, el poro presentaría dos componentes estructurales: un anillo interno que interactuaría directamente con los iones permeantes (TM2), y un escudo externo que aislaría a este anillo del entorno lipídico de la membrana (TM1, TM3 y TM4). Más aún, existen evidencias que los TM2 no hacen contactos de tipo Van der



Waals extensivos con TM1 ni con TM3, sugiriendo que los TM2 estarían separados de las otras hélices por un espacio lleno de agua. Sin embargo, existen algunas zonas de contacto íntimo entre las cadenas laterales hidrofóbicas de los TM2 y TM3 y de los TM2 y TM1 (Miyazawa et al., 2003). Estas interacciones podrían afectar los movimientos relativos de las hélices internas y del escudo externo durante el *gating*. Esta disposición sería consistente con trabajos que han demostrado que la parte interna del canal se mueve al activarse el receptor, mientras que la externa permanece sin cambios (Unwin, 1995).

Estudios de rastreo por accesibilidad de cisteínas (SCAM) han sugerido que el poro propiamente dicho del nAChR muscular estaría constituido también por residuos del extremo N-terminal del TM1 (Akabas y Karlin, 1995; Zhang y Karlin, 1997).

Una probable alineación del TM2 puede hacerse a partir de las densidades tridimensionales y de su secuencia aminoacídica (Unwin, 1993). Esta alineación ubica los grupos cargados negativamente de forma simétrica en ambos extremos del TM2, y una leucina altamente conservada ( $\alpha$ Leu251 o  $\alpha$ Leu9', *Torpedo*) en la curvatura. Parecería que estas  $\alpha$ Leu9' y las  $\alpha$ Val13', a través de interacciones con grupos vecinos, estarían involucradas en la formación de la compuerta del canal (Miyazawa et al., 2003). Sin embargo, otros experimentos han indicado que la compuerta se ubicaría en una zona más cercana al extremo citoplasmático (Wilson y Karlin, 1998).

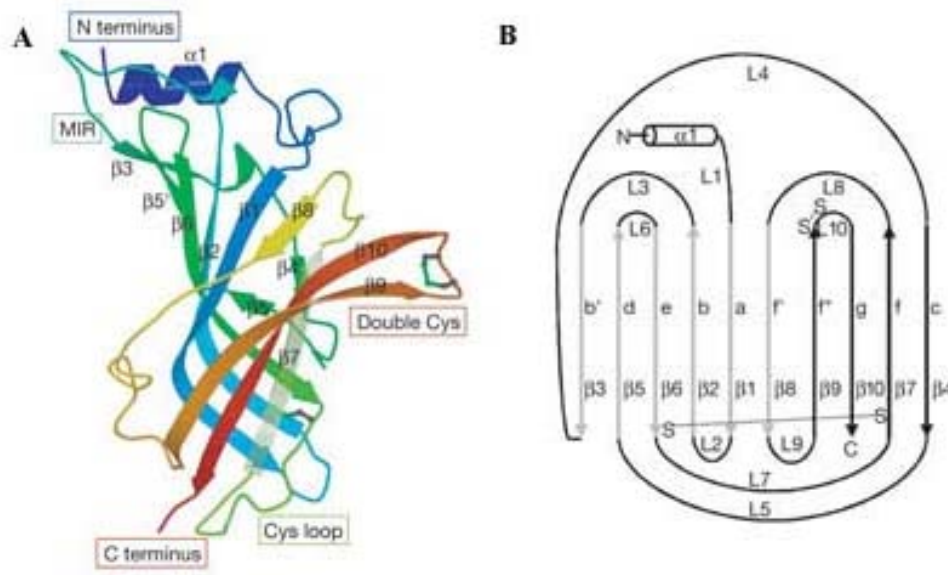


**Figura 4 Esquema del segmento TM2 (subunidad  $\alpha$  de *Torpedo*).** El residuo ubicado cerca de la mitad de la membrana (gris) es la leucina 251 (posición 9') altamente conservada entre los miembros de la superfamilia, la cual estaría involucrada en la formación de la compuerta del canal. Los números se refieren al sistema usado en el texto para denominar a los residuos del TM2.

## La proteína unidora de acetilcolina

Las células gliales del caracol *Lymnea stagnalis* producen y secretan a las sinapsis colinérgicas una proteína soluble que modula la transmisión sináptica al unir ACh. La proteína unidora de ACh (AChBP) es un homopentámero que presenta homología estructural con el dominio N-terminal de los canales iónicos de la superfamilia de asa de cisteínas. El protómero de AChBP está compuesto por 210 aminoácidos y presenta un 20-23% de identidad de secuencia con las secuencias de las regiones N-terminales de las subunidades del nAChR muscular, y un 15-18% de identidad con las secuencias de los dominios N-terminales de las subunidades de los receptores 5-HT<sub>3</sub>, GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>C</sub> y glicinérgicos. Contiene la mayoría de los residuos propuestos de formar parte del dominio de unión de ACh. Su estructura cristalina a una resolución de 2.7Å (Brejc et al., 2001, Figura 5) revela que el protómero está organizado alrededor de dos hojas  $\beta$ , una interna y otra externa, plegadas en un *sándwich*  $\beta$ . Cada hoja  $\beta$  está compuesta por hebras antiparalelas y lazos interconectores. Las hojas  $\beta$  interna y externa se encuentran unidas entre sí covalentemente por un puente disulfuro. Este puente disulfuro (C128 - C142 en *Torpedo* y subunidades  $\alpha 1$  humanas) está totalmente conservado a lo largo de la superfamilia de canales iónicos y provoca la formación del denominado asa de cisteínas.

Se ha propuesto que el asa de cisteínas jugaría un papel clave en la estabilización de la estructura tridimensional del dominio de unión de ACh y que debido a su ubicación posiblemente interactuaría con dominios transmembranales del receptor (Brejc et al., 2001). Otra zona de la AChBP, denominada lazo 2 o lazo  $\beta 1$ - $\beta 2$ , también se encontraría en una posición cercana a la superficie de la membrana. Estos hallazgos llevaron a postular que estos dos lazos podrían estar interactuando con los dominios transmembranales durante el proceso de activación del receptor (Brejc et al., 2001).

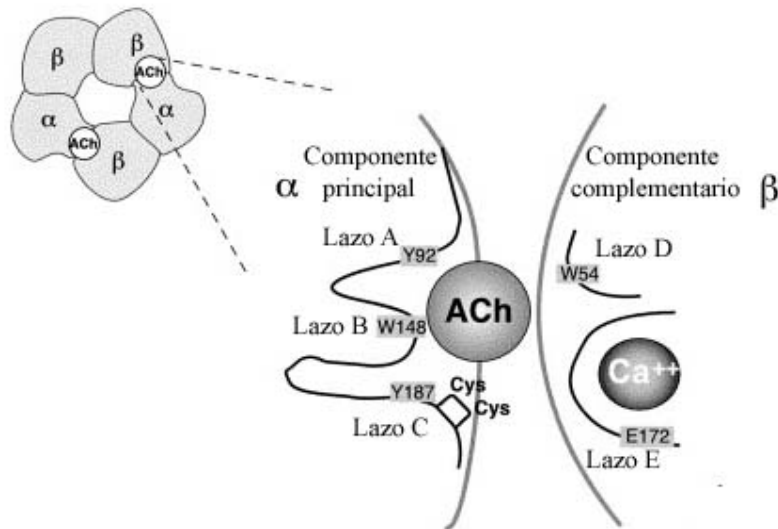


**Figura 5 A**, Representación en cintas de un protómero de la AChBP, visto desde afuera del anillo pentamérico. La cinta está coloreada con un gradiente de colores que va desde el azul (N-terminal) al rojo (C-terminal). En verde se señalan los puentes disulfuro. En un canal iónico entero, el extremo N-terminal apuntaría hacia la brecha sináptica y el C-terminal entraría en la membrana, continuándose en el dominio TM1. **B**, Diagrama de la topología del protómero de AChBP. Las hebras de las hojas  $\beta$  se denominan  $\beta 1$ - $\beta 10$  y los lazos que las unen L1-L10. S: puente disulfuro.

### El dominio de unión a ACh

El nAChR muscular presenta dos sitios de unión a ACh que se localizan en el dominio extracelular N-terminal (Reynolds y Karlin, 1978). Existen evidencias que indican que estos sitios no son equivalentes (Blount y Merlie, 1989; Martínez y Corringier, 2000; Prince y Sine, 1999).

Se ha propuesto que la unión de ACh se produce a través de interacciones catión- $\pi$ , donde la carga positiva del amonio cuaternario de la ACh interactúa con las cadenas laterales de grupos aromáticos de la molécula receptora (Zhong, 1998). La estructura cristalina de la AChBP muestra que esta zona de residuos aromáticos reside en un bolsillo cercano a las interfases  $\alpha/\delta$  y  $\alpha/\gamma$  que está formado por seis lazos (A-F, Esquema 1).



**Esquema 1 El sitio de unión para ACh del nAChR.** Modelo de la organización de las subunidades de un receptor neuronal heteromérico  $\alpha/\beta$ . Se muestran los componentes principal y complementario del sitio de unión para ACh formado entre una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$ . Los aminoácidos indicados son los involucrados en la formación del sitio de unión. Sólo se muestran dos de los tres lazos del componente complementario.

Los lazos A-C constituyen el componente principal del sitio de unión y se ubican en la cadena polipeptídica  $\alpha$ . Los lazos D-F corresponden al componente complementario y se encuentran en las subunidades  $\delta$  y  $\epsilon$  del nAChR muscular, en las subunidades  $\beta$  de los receptores neuronales heteroméricos y en las subunidades  $\alpha$  de los nAChR homoméricos (Corringer, 2000). Evidencias experimentales indican que estos residuos aromáticos son: Y93 (lazo A), W149 (lazo B), Y190 y Y198 (lazo C) (según numeración  $\alpha 1$ ),  $\gamma W55$  (lazo D),  $\gamma Y111$  (lazo E),  $\gamma D174$  (lazo F), y los equivalentes en la subunidad  $\delta$  (Chiara, 1997; Xie, 2001).

Estudios de marcación química han demostrado que las cisteínas  $\alpha C192$  y  $\alpha C193$  también contribuirían al sitio de unión de ACh (Kao y Karlin, 1986).

## EL MECANISMO DE ACTIVACIÓN

El cambio estructural que ocurre durante la transición del estado cerrado al abierto ha sido estudiado a una resolución de 9Å por comparación de los mapas tridimensionales de la conformación cerrada, obtenido como se indicó anteriormente,

con el correspondiente al estado abierto, obtenido tras la aplicación de ACh en aerosol sobre los túbulos y luego enfriándolos rápidamente (Unwin, 1995).

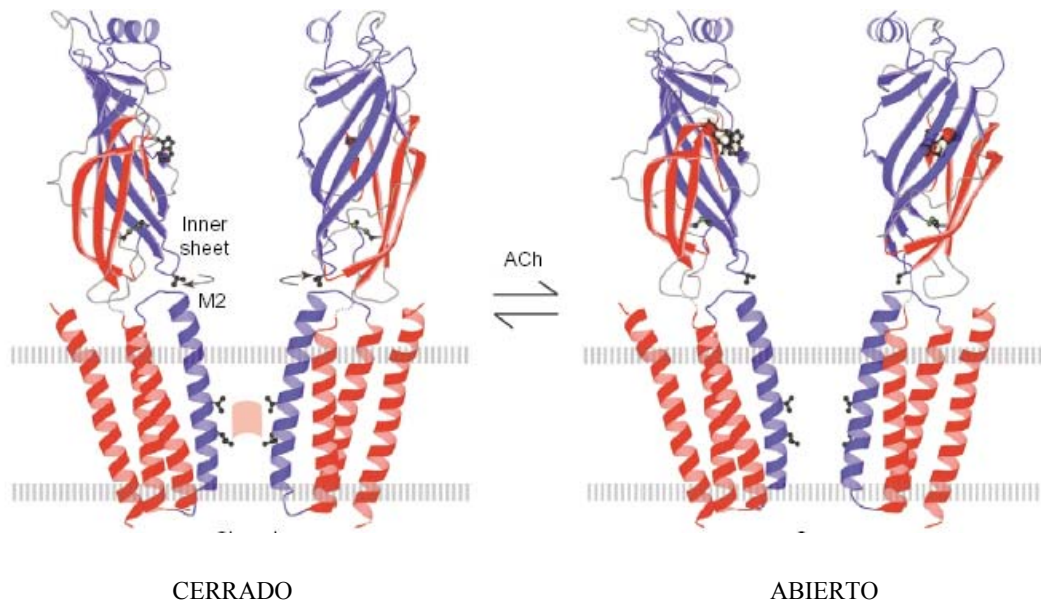
La comparación de estas dos estructuras indica que la unión de ACh inicia dos eventos interconectados en el dominio extracelular. Uno de ellos comprende un cambio local que involucra a las cinco subunidades, en la región de los sitios de unión de ACh, y el otro es un cambio conformacional más extenso que involucra principalmente a las dos subunidades  $\alpha$ , las cuales a su vez transmiten ese cambio a la porción transmembranal.

En la membrana, la exposición a la ACh no provoca ningún cambio obvio en la estructura externa del receptor que se encuentra en contacto con los lípidos, mientras que las hélices TM2 cambian drásticamente a una nueva conformación en la cual las curvaturas en vez de apuntar hacia el eje del poro rotan en sentido horario hacia el costado. Este arreglo tiene el efecto de abrir el poro en la zona media y angostarlo hacia la superficie de la membrana citoplasmática, donde las hélices  $\alpha$  ahora se acercan lo suficiente como para interactuar con las hélices vecinas a través de interacciones entre las cadenas laterales de sus grupos funcionales. De esta manera, parecerían existir dos conformaciones alternativas de las hélices TM2 alrededor del poro: una (la configuración cerrada) estabilizada por interacciones entre hélices  $\alpha$  vecinas cerca de la mitad de la membrana, y otra (la configuración abierta) estabilizada por interacciones cerca de la superficie de la membrana. Este número limitado de interacciones, combinadas con una estructura rígida de las hélices  $\alpha$ , podrían ser importantes para asegurar la permeación y la rápida cinética de *gating* característica de los nAChRs.

Se ha sugerido que una línea de residuos polares pequeños (serina o treonina) podría alinearse paralela al eje del poro cuando el canal se abre (Unwin, 1995), lo cual debería estabilizar a los iones permeantes al proveer un entorno de alta polaridad. La sustitución del residuo  $\alpha$ T244 de *Torpedo* o  $\alpha$ T2' (según Figura 4) por residuos de diferentes volúmenes, tiene un efecto pronunciado en el flujo iónico, como si se encontrara en la zona más estrecha del poro abierto (Villarroel y Sakmann, 1992). El diámetro de esta porción del canal, calculada a partir de las permeabilidades de moléculas pequeñas no cargadas, es de aproximadamente 10Å (Cohen et al., 1992; Dwyer et al., 1980). Este valor es similar al obtenido por métodos estructurales.

Un esquema simplificado de las transiciones estructurales derivadas de este

estudio se ilustra en la Figura 6. Primero, la ACh desencadena un cambio localizado en la zona de los sitios de unión. Luego, ese cambio se propaga por rotaciones axiales, involucrando las subunidades  $\alpha$ , hacia las hélices TM2 en la membrana. Por último, las hélices TM2 transmiten las rotaciones a las cadenas laterales de los residuos que forman la compuerta, moviéndolas del eje central hacia los costados. De esta forma, la asociación en la región cercana a la mitad de la membrana está desfavorecida y las hélices cambian al modo de interacción alternativo, generando un poro abierto.



**Figura 6 Modelo simplificado del mecanismo de apertura del canal sugerido por experimentos resueltos por microscopía electrónica.** La unión de ACh a ambas subunidades  $\alpha$  inicia un cambio concertado a nivel de las hojas  $\beta$  de los sitios de unión, que conlleva a leves rotaciones de las subunidades  $\alpha$  a nivel de la membrana. Las rotaciones desestabilizan las interacciones hidrofóbicas de las hélices  $\alpha$  que forman la compuerta (rosa), y favorecen el modo alternativo de asociación, en el cual el poro está abierto. (Unwin, 1998).

Una descripción más precisa de estos cambios conformacionales se ha obtenido recientemente por comparación de la estructura resuelta a 4.6Å del dominio extracelular, a partir de la estructura cristalina de la AChBP (Unwin et al., 2002). Se encontró que hay dos conformaciones alternativas de las subunidades del receptor - una característica de las subunidades  $\alpha$  antes de la activación y otra característica de las tres subunidades no  $\alpha$  - y que la unión de ACh convierte las estructuras de las dos subunidades  $\alpha$  a las de las no  $\alpha$  (Unwin et al., 2002). Evidentemente, las subunidades

$\alpha$  están distorsionadas inicialmente por las interacciones con las subunidades vecinas, y tras la unión de ACh, la energía libre de unión supera esas distorsiones haciendo más simétrico todo el ensamblado. La conversión del receptor a un estado más simétrico sería una propiedad adicional y fundamental del mecanismo de activación. Esta transición hacia la conformación activada del receptor involucra movimientos relativos de las partes internas y externas de la hoja  $\beta$ , la cual compone el núcleo de las subunidades  $\alpha$ , alrededor del asa de cisteínas.

Más aún, ocurren rotaciones en sentido horario 15-16° de las cadenas polipeptídicas en la superficie interna del vestíbulo cerca de las regiones transmembranales. Los dominios TM2, y también el lazo TM2-TM3 se ubican directamente debajo de estos elementos que rotan. La importancia del lazo TM2-TM3 en el *gating* fue inicialmente sugerida por el grupo de Schofield como una interpretación de los cambios en la sensibilidad al agonista provocadas por mutaciones en esta área en el receptor de glicina, usando la técnica de rastreo por mutagénesis de grupos alanina y curvas de concentración respuesta microscópicas (Lynch et al., 1997; Rajendra et al., 1995). Estudios al nivel de canal único, basados en un modelo preliminar posible del mecanismo de activación del receptor de glicina, confirmaron que la mutación  $\alpha$ K276E en el lazo TM2-TM3 provoca cambios en el *gating* (Lewis et al., 1998).

En el nAChR también existen evidencias de que el lazo TM2-TM3 es importante en el *gating* del canal (Bouzat et al., 2004; Campos-Caro et al., 1996; Grosman et al., 2000). Grosman y colaboradores demostraron que este lazo es un elemento de control del *gating* del nAChR muscular, donde la hidrofobicidad de los residuos que lo componen juega un papel importante en dicho control. Más recientemente Bouzat y colaboradores demostraron que el lazo TM2-TM3 y tres lazos del dominio N-terminal extracelular (el asa de cisteínas y los lazos  $\beta$ 1- $\beta$ 2 y  $\beta$ 8- $\beta$ 9 de la hoja  $\beta$  interna) interaccionan entre sí sinérgicamente permitiendo un acople alostérico bidireccional entre los sitios de unión de ACh y el poro del canal. El modelo estructural propuesto por estos autores sugiere la existencia de interacciones directas entre el asa de cisteínas y el lazo  $\beta$ 1- $\beta$ 2, mientras que el lazo  $\beta$ 8- $\beta$ 9 hace contacto indirectamente con el asa de cisteínas. Dicho modelo también propone que el lazo TM2-TM3 se intercala entre el asa de cisteínas y el lazo  $\beta$ 1- $\beta$ 2, sugiriendo que durante el proceso de acople el movimiento de los lazos del dominio extracelular induciría el

movimiento del lazo TM2-TM3 que luego se propagaría hacia el poro provocando la apertura del canal.

Todas estas evidencias indican que, al menos en el nAChR, las subunidades  $\alpha$  son las que median el acoplamiento entre la unión de ACh a su sitio y el *gating* del canal. Los cambios conformacionales en los TM2 de las subunidades  $\alpha$  se transmiten eficientemente a los TM2 de las otras subunidades a través de interacciones hidrofóbicas a lo largo de dicho dominio (Miyazawa et al., 2003). De esa manera se lograría con alta eficiencia un rápido *gating* del canal al minimizar el número de moléculas de agonista necesarias para desencadenar el proceso. Esto estaría de acuerdo con evidencias que indican que la transición de cerrado a abierto dura menos de 3  $\mu$ s (Maconochie et al., 1995), y que el canal se cierra por intervalos muy cortos (media de 12  $\mu$ s) para luego reabrirse.

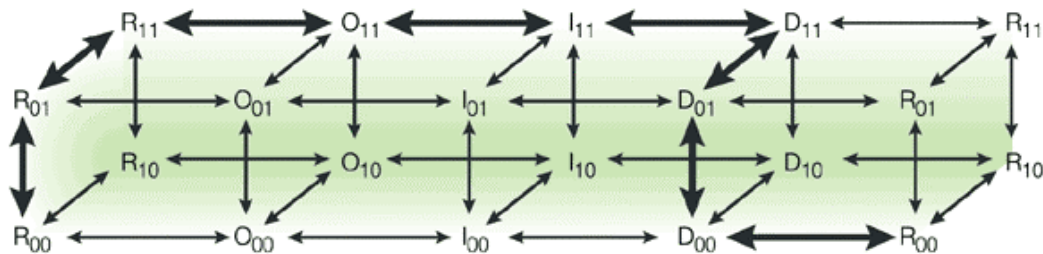
## **EL RECEPTOR NICOTÍNICO: UNA PROTEÍNA CON TRANSICIONES ALOSTÉRICAS**

La activación y desensibilización del nAChR ha sido interpretado en términos de una versión adaptada del esquema propuesto por Monod, Wyman y Changeux, para transiciones alostéricas (Monod et al., 1965), que incorpora además los estados múltiples propuestos por Katz y Thesleff (1957). Este esquema propone que el nAChR es una proteína oligomérica que sufre transiciones entre un pequeño número de conformaciones discretas con distintas propiedades de unión de ligandos y de estados de apertura del canal iónico. La unión de los ligandos al receptor modifica las constantes de equilibrio y cinéticas, afectando la proporción de receptores que existen en cada estado, sin alterar significativamente las propiedades intrínsecas de dichos estados. Experimentos de unión de radioligandos y de flujo iónico con fragmentos de membrana del órgano eléctrico de *Torpedo* (Changeux, 1990a), así como registros electrofisiológicos realizados en el mismo sistema, son consistentes con este esquema.

El modelo propone que el nAChR existe en un mínimo de cuatro conformaciones interconvertibles (Changeux, 1990a; Sakman et al., 1980): el estado de reposo (R), el estado activo (A) con el canal abierto y una baja afinidad por la ACh (Kd entre 10  $\mu$ M y 1 mM) y dos estados desensibilizados con el canal cerrado (I y D) que son refractarios a la activación pero que presentan una alta afinidad (Kd entre 10



nM y 1  $\mu$ M) para ligandos nicotínicos (agonistas y algunos antagonistas). El estado R es el más estable en ausencia del agonista, y el estado I es el más estable en presencia del agonista. R e I son estados metaestables ya que sus proporciones aumentan transitoriamente y alcanzan un valor muy bajo en el equilibrio. La cinética de las transiciones entre estos estados ha sido resuelta para el nAChR de *Torpedo in vitro*. La tasa de isomerización entre los estados R y A se encuentra en el orden de los  $\mu$ s a ms, hacia I en el rango de ms y hacia D entre los s y min (Changeux, 1990a). El esquema de estas transiciones alostéricas también asume que estas conformaciones existen en equilibrio previamente a la unión del ligando al receptor (Monod et al., 1965). Además, se ha reportado que en ausencia de ligando, cerca del 20% de las moléculas de nAChR presentes en las preparaciones de membrana de *Torpedo*, se encuentran en la conformación D (Heidmann y Changeux, 1979; 1979b), y que se detectan aperturas espontáneas del canal, aunque en muy baja frecuencia, en células musculares embrionarias murinas (Jackson, 1984). Los ligandos nicotínicos estabilizarían de manera diferencial el estado al cual prefieren unirse (Rubin y Changeux, 1966). Las drogas agonistas (ACh, nicotina) estabilizarían el estado A y también los estados I y D. En cambio los antagonistas competitivos estabilizarían el estado R (por ej,  $\alpha$ -bungarotoxina), aunque finalmente algunos de ellos estabilizarían los estados desensibilizados (por ej, d-tubocurarina).



**Esquema 2 Las transiciones entre los cuatro estados conformacionales del nAChR.** R representa el estado de reposo, O el estado activo con el canal abierto, I y D representan los estados desensibilizados, refractarios a la activación y con alta afinidad por los ligandos nicotínicos. Se asume que los dos sitios de unión de ligando son distintos. Los subíndices indican el estado de ocupación de dichos sitios: 00, desocupado; 01 o 10 sólo un sitio ocupado; 11, ambos sitios ocupados. Se asume que los estados R y D están conectados directamente por transiciones permitidas. Las flechas de trazo más grueso indican la ruta principal de transiciones.

## LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS NEURONALES

### GENES

La primera gran diferencia entre los nAChRs neuronales y el muscular está dada por el vasto número de genes que codifican para las subunidades neuronales, incluyendo nueve subunidades  $\alpha$  ( $\alpha 2$  a  $\alpha 10$ ) y tres subunidades  $\beta$  ( $\beta 2$  a  $\beta 4$ ) (ver Tabla 1). La pregunta que surge entonces es qué combinación de estas subunidades resulta en receptores funcionales, y más importante aún, cuáles de ellos se expresan en células neuronales y cumplen un papel relevante en la función de dichos nAChRs.

Una primera aproximación a responder estos interrogantes ha sido la de expresar en sistemas heterólogos las distintas combinaciones de subunidades de nAChRs y determinar qué combinaciones resultaban en receptores funcionales:

- Algunas subunidades  $\alpha$  pueden formar receptores homoméricos. Entre las subunidades de mamífero se encuentran  $\alpha 7$  y  $\alpha 9$ .
- Otras subunidades  $\alpha$  ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  y  $\alpha 6$ ) sólo forman receptores funcionales al combinarse con subunidades  $\beta$  ( $\beta 2$  o  $\beta 4$ ); estos receptores heteroméricos  $\alpha/\beta$  presentan una estequiometría de 2  $\alpha$  y 3  $\beta$  (Anand et al., 1991; Boorman et al., 2000; Cooper et al., 1991) y por analogía con el nAChR muscular se sugiere una topología de  $\alpha\beta\alpha\beta\beta$ .
- $\alpha 10$  participa en la formación de un nAChR sólo si se coexpresa con  $\alpha 9$  (Elgoyhen et al., 2001; Sgard et al., 2002). La estequiometría de este receptor aún se desconoce.
- $\alpha 5$  y  $\beta 3$  pueden formar un nAChR sólo si se coexpresan con un par de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  “clásicas” (por ej.  $\alpha 2$ -  $\alpha 4$  más  $\beta 2$  o  $\beta 4$ ); estos receptores están formados por dos copias de cada subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  “clásica” más una copia de  $\alpha 5$  o  $\beta 3$  (Boorman et al., 2000; Groot-Kormelink et al., 2001; Ramirez-Latorre et al., 1996).

Gracias a la combinación de la información obtenida en los trabajos de expresión en sistemas heterólogos con estudios del patrón de expresión de las distintas subunidades en células del SNC y SNP, mediante la técnica de hibridización *in situ*, se

conoce que  $\alpha 4$  y  $\beta 2$  son las subunidades que forman receptores heteroméricos que se expresan más abundantemente y de manera más difusa en el SNC, mientras que  $\alpha 3$  y  $\beta 4$  son las subunidades más importantes en los ganglios autónomos y células cromafines. Otras subunidades tienen una localización aún más discreta:  $\alpha 6$  se concentra en núcleos catecolaminérgicos del cerebro (Le Novère et al., 1996) y  $\beta 3$  se presenta en la sustancia negra, el cuerpo estriado, el cerebelo y la retina (Forsayeth y Kobrin, 1997; Sargent, 2000). Los transcritos de  $\alpha 7$  se encuentran tanto en el SNC como en el SNP, mientras que la expresión de  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  está confinada principalmente a la cóclea.

## **PROPIEDADES GENERALES**

La primer gran distinción funcional es entre receptores homoméricos y heteroméricos. La propiedad más distintiva de los primeros es su sensibilidad a la  $\alpha$ -bungarotoxina y la metillicaconitina (MLA), y su alta permeabilidad al ión calcio. Los receptores heteroméricos  $\alpha/\beta$  pueden diferenciarse por sus distintas sensibilidades a agonistas y antagonistas. Por ejemplo, la citisina es más potente y eficaz en receptores que contienen la subunidad  $\beta 4$  que los que contienen la  $\beta 3$  (Luetje y Patrick, 1991). Entre los antagonistas, la conotoxina  $\alpha$ -CTx MII es específica para nAChRs que contienen las subunidades  $\alpha 3$  y  $\beta 2$  (Cartier et al., 1996), y la  $\alpha$ -CTx AuIBA es específica para nAChRs que contienen las subunidades  $\alpha 3$  y  $\beta 4$  (Luo et al., 1998).

Las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  forman un grupo especial dentro de la familia de subunidades nicotínicas. Constituyen una subfamilia separada del resto de subunidades, que se encuentra más cercana al ancestro evolutivo del cual derivan. Además, la expresión de estas subunidades en oocitos resulta en nAChRs homomérico  $\alpha 9$  y hetromérico  $\alpha 9\alpha 10$ , que son activados por ACh pero no por nicotina, y que son bloqueados por  $\alpha$ -bungarotoxina y MLA (Elgoyhen et al., 1994; Elgoyhen et al., 2001). Más aún, presentan un patrón de expresión restringido que incluye a las células ciliadas de la cóclea y a los linfocitos, pero que excluye a las células neuronales.

## PROPIEDADES BIOFÍSICAS

### Ión calcio

El calcio presenta múltiples efectos sobre los nAChRs: no sólo es un ión permeante sino que afecta la conductancia a nivel de canal único y modula la respuesta a los agonistas.

Todos los nAChRs son permeables al  $\text{Ca}^{2+}$ : los más permeables son los receptores  $\alpha 7$  (Bertrand et al., 1993a; Castro y Albuquerque, 1995; Fucile et al., 2000; Sands et al., 1993),  $\alpha 9$  (Jagger et al., 2000; Katz et al., 2000) y  $\alpha 9\alpha 10$  (Sgard et al., 2002; Weisstaub et al., 2002). Lo que reviste importancia fisiológica es que la entrada de calcio a través de los nAChRs es suficiente como para actuar como señal post-sináptica, por ejemplo, activando canales de potasio dependientes de calcio (SK) en las células ciliadas externas de la cóclea (Oliver et al., 2000) o contribuyendo a la hiperpolarización sensible a apamina en los ganglios óticos de rata (Callister et al., 1997).

Por otro lado, la depresión de las respuestas a altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular se debería a una reducción de la conductancia de canal único (Bregestovski et al., 1979; Lewis, 1979; Mathie et al., 1987; Mulle et al., 1992a; Neuhaus y Cachelin, 1990; Vernino et al., 1992).

La presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (en el rango milimolar bajo) modula la actividad de estos receptores. El aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  incrementa la amplitud de las respuestas producidas por bajas concentraciones de ACh en receptores nativos y recombinantes, disminuyendo la  $\text{CE}_{50}$  a ACh y aumentando el  $n$  de Hill (Buisson et al., 2000; Mulle et al., 1992b; Vernino et al., 1992; Zhou y Neher, 1993). Este efecto está ausente en nAChRs musculares embrionarios (Vernino et al., 1992). En los receptores  $\alpha 7$  nativos y recombinantes (Bonfante-Cabarcas et al., 1996) y en el recombinante  $\alpha 9\alpha 10$  (Weisstaub et al., 2002) se observa un efecto bifásico: potenciación de las respuestas a concentraciones submilimolares de  $\text{Ca}^{2+}$  y depresión de las respuestas a concentraciones mayores. Se ha postulado que los residuos 161-172 (Galzi et al., 1996a) y también E44, D41 y D43 (Le Novère et al., 2002) de  $\alpha 7$  son importantes para el efecto potenciador del  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **Conductancia de canal único**

Los principales determinantes estructurales de la conductancia de los nAChRs a nivel de canal único serían los residuos -4', 1' y 20' del TM2 (Buisson et al., 2000). Si bien la secuencia del TM2 está altamente conservada entre las subunidades neuronales, el residuo -4' está cargado negativamente en todos menos en las subunidades  $\alpha 5$  y  $\alpha 9$ , que tienen un residuo neutro en esa posición. La posición 1' está siempre cargada negativamente. La posición 20' tiene un residuo cargado negativamente en todas las subunidades salvo en  $\beta 2$  y  $\beta 4$ .

La conductancia al nivel de canal único no es un buen parámetro para caracterizar los nAChRs, ya que presentan múltiples niveles de conductancia que se superponen y varían según el sistema de expresión (Lewis et al., 1997). Además, la conductancia es extremadamente sensible a la presencia de iones divalentes y su determinación está desfavorecida por el fenómeno de “rundown”, factores que dificultan el uso de este parámetro para caracterizar e identificar a los nAChRs.

### **Rectificación entrante**

Una propiedad sobresaliente de los nAChRs es la marcada rectificación entrante presente en las curvas corriente vs. voltaje (curvas IV), que se refleja en la ausencia de corrientes a potenciales entre -10 y +60 mV. La excepción la presentan los receptores  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  de la cóclea (Elgoyhen et al., 1994; Elgoyhen et al., 2001; Jagger et al., 2000).

## **LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS NEURONALES NATIVOS: SU PAPEL FISIOLÓGICO**

Los nAChRs se expresan en una gran variedad de neuronas, tanto en el SNC como en el SNP, y en células no neuronales (Elgoyhen et al., 1994; Elgoyhen et al., 2001; Wessler et al., 1998). Éste último es el caso del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$ , el cual se expresa en las células ciliadas de la cóclea, por ejemplo.

## Sistema Nervioso Central

En el SNC los nAChRs nicotínicos son menos abundantes que los receptores muscarínicos. Sin embargo, están ampliamente distribuidos y se los encuentra en áreas como hipocampo, tálamo, ganglios de la base, cerebelo y retina.

El nAChR más abundante en el SNC es el  $\alpha 4\beta 2$ , el cual corresponde a sitios de unión de alta afinidad para [ $^3\text{H}$ ]nicotina. Otros tipos de receptores presentan una distribución más acotada y podrían ser importantes en lugares discretos del SNC: la subunidad  $\alpha 6$  en ganglios de la base y neuronas catecolaminérgicas (Göldner et al., 1997; Klink et al., 2001; Le Novère et al., 1996; Léna et al., 1999), y el receptor  $\alpha 3\beta 4$  en habénula y núcleo interpeduncular. Los receptores  $\alpha 7$  también están presentes en forma abundante y corresponden a los sitios de alta afinidad para [ $^{125}\text{I}$ ]  $\alpha$ -bungarotoxina.

## Sistema Nervioso Periférico

En el SNP estos receptores median la transmisión sináptica rápida en ganglios autonómicos y en las sinápsis colinérgicas eferentes en las células ciliadas externas de la cóclea.

### *Ganglios autonómicos*

Datos experimentales del patrón de expresión de subunidades, de ensayos de inmunoprecipitación y aquellos obtenidos mediante el uso de mensajeros antisentido concuerdan en que los receptores  $\alpha 3\beta 4$  son los responsables principales de la fisiología sináptica de las neuronas de los ganglios autonómicos, incluyendo a las células cromafines. (Campos-Caro et al., 1997; Conroy y Berg, 1995; Listerud et al., 1991; Rust et al., 1994). Las neuronas de los ganglios autonómicos también expresan receptores  $\alpha 7$ , y se han encontrado transcritos de esta subunidad en células cromafines (García-Guzmán et al., 1995)

### *El oído interno*

Las células ciliadas externas de la cóclea reciben inervación colinérgica desde

el complejo olivar superior. La transmisión está mediada por nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$ , cuya alta permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  y su acoplamiento a canales de potasio sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$ , determinan que la corriente entrante colinérgica sea sobrepasada por la corriente saliente de potasio (Ashmore, 1994; Fuchs y Murrow, 1992b) produciendo hiperpolarización de las células ciliadas. Tanto los receptores nativos de las células ciliadas externas como los recombinantes  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  presentan características únicas: no son activados por nicotina, y son bloqueados por estrocnina, bicuculina y serotonina (Elgoyhen et al., 1994; Elgoyhen et al., 2001; Housley y Ashmore, 1991).

## **EL RECEPTOR NICOTÍNICO COLINÉRGICO DE LAS CÉLULAS CILIADAS DEL OÍDO INTERNO**

### **LA CÓCLEA**

El órgano de Corti constituye el epitelio sensorial de la cóclea y contiene las células ciliadas, que son las responsables de la transducción de estímulos auditivos en señales eléctricas. Dicho órgano descansa sobre la membrana basilar y está bañado por dos fluidos cocleares: la endolinfa en la zona apical y la perilinfina en la región basolateral. Los estímulos sonoros que atraviesan el oído externo, son traducidos en cambios de presión en los fluidos cocleares, generándose un movimiento ondular de la membrana basilar (Dallos, 1996), y en consecuencia, el movimiento de las cilias de las células sensoriales presentes en el órgano de Corti (Hudspeth, 1985).

En los mamíferos, las células ciliadas se dividen anatómicamente en: células ciliadas internas (CCI) y células ciliadas externas (CCE). Las CCI son los fonoreceptores, capacitados para decodificar estímulos auditivos y traducirlos en señales eléctricas, que son transmitidas y procesadas por el SNC.

Por otro lado, las CCE están implicadas en la amplificación mecánica del sonido y en la sintonización fina de la membrana basilar (Ashmore, 1987).

### **LA INERVACIÓN EFERENTE DE LAS CÉLULAS CILIADAS EXTERNAS DE LA CÓCLEA**

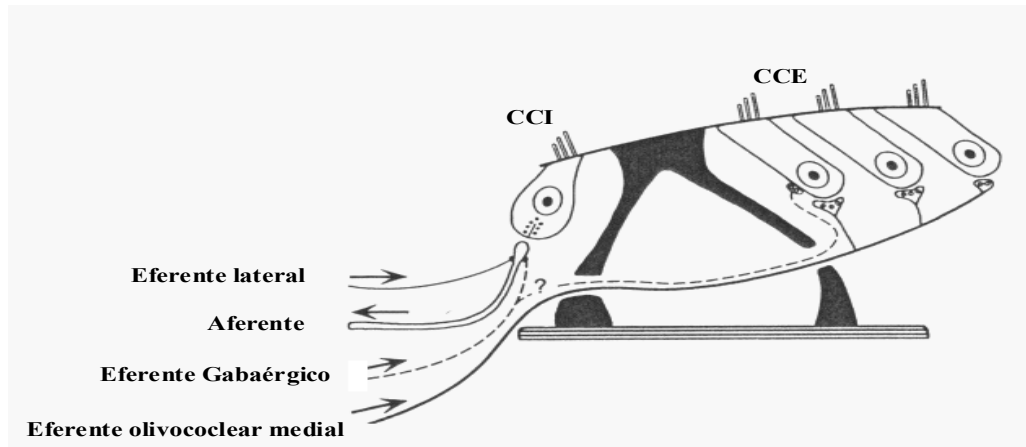
Si bien las CCE modifican la mecánica de la cóclea sin intervención del SNC, estas células reciben una inervación eferente colinérgica proveniente del sistema olivococlear medial (Guinan et al., 1983; Liberman, 1980). La estimulación de esta vía eferente provoca principalmente la liberación del neurotransmisor ACh y la consecuente activación de un receptor colinérgico que presenta un perfil farmacológico peculiar y que además es muy permeable a calcio. La ACh genera de esta forma una pequeña despolarización, que precede a una marcada hiperpolarización debido a la estimulación de canales de  $K^+$  activados por calcio de tipo SK (Blanchet et



al., 1996; Erostequi et al., 1994a; Evans, 1996; Housley y Ashmore, 1991).

La función de esta inervación eferente a las CCE es aún hoy materia de controversia: favorecería la detección de la señal auditiva en ambientes ruidosos (Nieder y Nieder, 1970), podría estar involucrada en la protección del oído interno ante el trauma acústico (Maison y Liberman, 2000; Winslow y Sachs, 1987), o intervendría en procesos de atención selectiva (Oatman, 1976; Scharf et al., 1997).

La gran importancia de las CCE y la modulación de su actividad por el sistema eferente colinérgico en la fisiología auditiva se ve reflejada en el hecho de que la interrupción de la interacción entre la membrana basilar y las CCE, debido al daño de estas células, es una de las causas más frecuentes de sordera de origen neurosensorial en humanos (Patuzzi et al., 1989).



**Esquema 3:** El dibujo muestra las estructuras sensoriales del órgano de Corti y su correspondiente inervación.

### **LA IDENTIDAD MOLECULAR DEL RECEPTOR COLINÉRGICO DE LAS CÉLULAS CILIADAS EXTERNAS**

Si bien desde hace más de un cuarto de siglo se sabe que el neurotransmisor liberado por el sistema eferente coclear medial de los mamíferos es la ACh, durante aproximadamente veinte años se trató de identificar el receptor colinérgico presente en las CCE. El perfil farmacológico peculiar de este receptor llevó a proponer que podía pertenecer tanto a la familia de canales iónicos activados por ligandos, como a la

familia de receptores acoplados a proteínas G (Chen et al., 1996; Fuchs y Murrow, 1992a; Kakehata et al., 1993). El receptor nativo presente en las células ciliadas externas es activado no sólo por ACh, sino también por el agonista colinérgico carbacol, el agonista nicotínico DMPP y el agonista muscarínico oxotremorina. El agonista clásico nicotina no es capaz de generar respuestas mediadas por este receptor. Más aún, este compuesto antagoniza las respuestas producidas por la aplicación de ACh. Sumado a este perfil farmacológico peculiar, este receptor es bloqueado por antagonistas nicotínicos como la *d*-tubocurarina y la  $\alpha$ -bungarotoxina, y por antagonistas muscarínicos como la atropina y antagonistas glicinérgicos como la estriknina. Estas evidencias habían llevado a postular que el receptor colinérgico presente en las CCE era de un subtipo desconocido (Erostegui et al., 1994b; Fuchs y Murrow, 1992b).

En el año 1994, Elgoyhen y colaboradores clonaron y caracterizaron una nueva subunidad de receptores colinérgicos nicotínicos llamada  $\alpha 9$ . La identidad de secuencia entre esta subunidad y el resto de los miembros de la familia de los nAChR es inferior al 39%, lo cual sugiere que  $\alpha 9$  es un miembro distante de la familia de los receptores nicotínicos (Elgoyhen et al., 1994). La subunidad  $\alpha 9$  tiene un patrón de expresión característico: estudios de hibridación *in situ* realizados en rata mostraron que se expresa en las CCE y CCI de la cóclea, en queratinocitos (Grando, 2000), en el epitelio nasal, y en la *pars tuberalis* de la pituitaria (Elgoyhen et al., 1994). Cuando la subunidad  $\alpha 9$  se expresa en forma heteróloga en oocitos de *Xenopus laevis* se obtiene un canal catiónico activable por ACh. Este canal presenta, sin embargo, una farmacología muy peculiar, similar a la del receptor nativo de las CCE, que lo diferencia del resto de los nAChRs y que hace difícil su clasificación farmacológica (Elgoyhen et al., 1994; Rothlin et al., 1999; Verbitsky et al., 2000). Otras características importantes del receptor  $\alpha 9$  son: su alta permeabilidad al calcio (Katz et al., 2000), la ausencia de desensibilización durante la aplicación del agonista, el bloqueo de las corrientes iónicas a concentraciones fisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$ , siendo este bloqueo dependiente del voltaje de la membrana (Katz et al., 2000).

A partir de estos resultados, se postuló que la subunidad nicotínica  $\alpha 9$  es un componente fundamental del receptor colinérgico presente en la base de las CCE (Elgoyhen et al., 1994). La función clave que tiene la subunidad  $\alpha 9$  en la sinapsis olivococlear fue confirmada, además, por el hecho de que ratones homocigotas para

una mutación nula en el gen que codifica para la subunidad  $\alpha 9$  no muestran supresión de las respuestas cocleares al estimular el nervio olivococlear (Vetter et al., 1999).

A pesar de la similitud farmacológica, el receptor nativo de las CCE de la cóclea presenta ciertas características biofísicas que difieren con respecto a lo observado para el receptor recombinante  $\alpha 9$ : las respuestas del receptor nativo evocadas por ACh se desensibilizan tanto durante la aplicación continua del agonista como ante aplicaciones sucesivas del mismo (Blanchet et al., 1996), y el ion  $\text{Ca}^{2+}$  potencia las corrientes producidas por ACh en el receptor nativo de cobayo (Blanchet et al., 1996; Evans, 1996) o ejerce una modulación bifásica, potenciación y bloqueo, sobre el receptor nativo de pollo (McNiven et al., 1996). Aún cuando estas discrepancias podrían deberse a alguna modificación post-traducciona diferencial entre el sistema heterólogo y el nativo, también podrían derivar de la posibilidad de que el receptor nativo estuviese compuesto por alguna otra subunidad además de  $\alpha 9$ .

En el año 2001, Elgoyhen y colaboradores clonaron y caracterizaron una nueva subunidad de receptores colinérgicos nicotínicos llamada  $\alpha 10$ . Esta nueva subunidad tiene un 36% de identidad de secuencia con las subunidades nicotínicas  $\alpha$  hasta entonces conocidas y una mayor homología con la subunidad  $\alpha 9$  (57%) (Elgoyhen et al., 2001). Se expresa en los órganos sensoriales del oído interno (Elgoyhen et al., 2001) y en queratinocitos (Sgard et al., 2002). La expresión de la subunidad  $\alpha 10$  en oocitos de *X. laevis* evidenció que esta subunidad es incapaz de formar receptores homoméricos funcionales. Sin embargo, la coexpresión con la subunidad  $\alpha 9$  genera receptores nicotínicos funcionales cuyas respuestas a ACh son 100 a 1000 veces más grandes que las obtenidas con el receptor recombinante homomérico  $\alpha 9$  (Elgoyhen et al., 2001). A diferencia de lo observado para el receptor homomérico  $\alpha 9$ , el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  se desensibiliza durante la aplicación continua del agonista, las respuestas evocadas por ACh son moduladas por el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular de manera bifásica (a concentraciones bajas de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, 0.2 mM, se observa un efecto potenciador, mientras que a mayores concentraciones se evidencia un efecto bloqueante) y la relación corriente-voltaje no presenta rectificación entrante (Elgoyhen et al., 2001). Aunque la presencia de la subunidad  $\alpha 10$  introduce algunas diferencias en las características biofísicas del receptor  $\alpha 9\alpha 10$  con respecto a lo observado para el nAChR  $\alpha 9$ , ambos receptores exhiben un perfil farmacológico muy similar, casi

idéntico al descrito para el receptor colinérgico nativo presente en las CCE de la cóclea (Elgoyhen et al., 2001).

La similitud de las propiedades farmacológicas y biofísicas del receptor  $\alpha 9\alpha 10$  con las del receptor nativo de las CCE, han llevado a sugerir que ambas subunidades forman parte del receptor colinérgico que se encuentra presente en la sinapsis entre las terminales eferentes olivococleares y las CCE (Elgoyhen et al., 2001).

## OBJETIVOS

1. Estudiar el papel de tres anillos de residuos hidrofóbicos del segundo paso transmembranal en el mecanismo de acople entre la unión del agonista y la apertura del canal (*gating*) del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$ .
2. Determinar la estequiometría de las subunidades que constituyen el nAChR  $\alpha 9\alpha 10$ .
3. Realizar la caracterización funcional de una  $\alpha$ -conotoxina que actúa selectivamente sobre el receptor  $\alpha 9\alpha 10$ .

## MATERIALES Y MÉTODOS

### GENERACIÓN DE LOS RECEPTORES MUTANTES

Se realizaron mutaciones puntuales de los ADNc de las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  de rata con el *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA). Para las citadas mutaciones se diseñaron y utilizaron los siguientes oligonucleótidos iniciadores (*primers*):

Oligo  $\alpha 9L9'$ T:

5' -CTCTGGGAGTGACCATCCTAACGGCCATGACTGTGTTTCAGC-3'

Oligo  $\alpha 9V13'$ T:

5' -CCTATTGGCCATGACTACGTTTCAACTAATGGTGGCAGAG-3'

Oligo  $\alpha 9M17'$ T:

5' -GGCCATGACTGTGTTTCAGCTAACTGTGGCAGAGATCATGCCAGCC-3'

Oligo  $\alpha 10L9'$ T:

5' -GGTGTCTCTGGGCGTCACCGTGCTCACGGCGCTCACCGTCTTCCAGCTGATCC-  
3'

Oligo  $\alpha 10V13'$ T:

5' -CGTCACCGTGCTCCTGGCGCTCACACCTTCCAAGTATCCTGGCCGAGAGC-  
3'

Oligo  $\alpha 10I17'$ T:

5' -CACCGTCTTCCAGCTGACTCTGGCCGAGAGCATGCCACC-3'

y sus complementarios antisentido.

Cuando fue posible, se incluyó en los oligonucleótidos una mutación silenciosa para la detección del genotipo mutante, mediante digestión con enzimas de restricción. Todas las mutaciones puntuales fueron confirmadas por secuenciación.

## EXPRESIÓN DE RECEPTORES RECOMBINANTES EN OOCITOS DE *XENOPUS LAEVIS* Y REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

### PRODUCCIÓN DE ARN<sub>C</sub>

Los ADN<sub>C</sub> completos de la subunidades nicotínicas y de las mutantes puntuales de  $\alpha 9$  y de  $\alpha 10$ , fueron subclonados en el plásmido pGEMHE, un vector que, para optimizar la expresión en oocitos de *Xenopus laevis*, incluye en los flancos del segmento de múltiples sitios de clonado (*polylinker*) secuencias de regiones no traducidas 5' y 3' de un gen de *Xenopus*, codificante de la  $\beta$ -globina (Liman et al., 1992). 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/ $\mu$ l; posteriormente tratados con proteinasa K (Sigma, EE.UU.) 100 $\mu$ g/ml por 30 min. a 50° C; sometidos a extracción con fenol:CHCl<sub>3</sub>; precipitados con EtOH y Cl<sub>3</sub>Li y resuspendidos en H<sub>2</sub>O libre de ARNasa. Los ARN<sub>C</sub> se obtuvieron mediante transcripción *in vitro* a partir de los plásmidos linealizados utilizando el *mMessage Machine T7 transcription kit* (Ambion Corp., Austin, TX). Las reacciones de transcripción se realizaron en presencia de un análogo de la caperuza (*cap*): Me<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G en proporción 4:1 con respecto a GTP.

### OBTENCIÓN Y MANUTENCIÓN DE LOS OOCITOS. PROCEDIMIENTOS GENERALES PARA LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LOS RECEPTORES RECOMBINANTES Y REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO

Los oocitos fueron extraídos quirúrgicamente de los ovarios de *Xenopus* anestesiadas con ~ 1 g/ml de 3-aminobenzoato de etilo (Sigma Co., EE.UU.) y 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 Ca<sup>2+</sup> (NaCl 96 mM, KCl 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, HEPES 5 mM, pH 7.6). Los oocitos fueron inyectados con 0.01-1 ng (50 nl) de ARN<sub>C</sub> utilizando una pipeta de microinyección y luego mantenidos a una temperatura de 17°C en una solución salina normal (NaCl 88 mM, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0.33 mM, KCl 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.41 mM, MgSO<sub>4</sub> 0.82 mM, NaHCO<sub>3</sub> 2.4 mM,

HEPES 10 mM, gentamicina 0.1 mg/ml, pH 7.4).

Los registros electrofisiológicos se realizaron de 2 a 7 días después de la inyección mediante el método de fijación de voltaje con dos microelectrodos (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, con una resistencia de  $\sim 1 \text{ M}\Omega$ , fue llenado con KCl 3M y los oocitos bañados por un flujo continuo ( $\sim 10 \text{ ml/min}$ ) de solución salina (NaCl 115 mM,  $\text{CaCl}_2$  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  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular 0 mM nominal, se utilizaron oocitos inyectados con 7.5 ng de un oligonucleótido (5'GCTTTAGTAATTCCCATCGTCCCATGTTTC 3') antisentido del ARN mensajero de Conexina 38 (Gerzanich et al., 1994; Katz et al., 2000) para minimizar la activación de las corrientes catiónicas no selectivas a través de los canales *hemigap junction* del oocito, activadas por la disminución de la concentración de iones divalentes extracelulares. Dado que la mutante 13' generó en los oocitos corrientes de sostén muy grandes, estos experimentos se realizaron en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  0.5 mM. Como se reportó anteriormente, el  $\text{Mg}^{2+}$  no potencia las respuestas a ACh, pero sí las bloquea (Weisstaub et al., 2002). Las drogas, disueltas en la misma solución salina, fueron aplicadas en el flujo.

Con el objeto de minimizar la activación de las corrientes endógenas de cloruro activadas por  $\text{Ca}^{2+}$  (Elgoyhen et al., 2001), todos los experimentos se realizaron en oocitos incubados por 3 horas en presencia del quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  BAPTA-AM 100  $\mu\text{M}$ , previo a los registros.

## CURVAS DE CONCENTRACIÓN – RESPUESTA

Las curvas de concentración-respuesta (CCR) fueron normalizadas a la respuesta máxima al agonista en cada oocito. La media y el error estándar de las respuestas fueron graficadas. Las curvas fueron ajustadas con la ecuación de Hill:

$$I/I_{\max} = A^n / (A^n + CE_{50}^n)$$

donde I es la amplitud de la corriente producida por el agonista a una concentración A;  $I_{\max}$  es la amplitud de la corriente máxima producida por una concentración



saturante del agonista;  $CE_{50}$  es la concentración de agonista que produce el 50% de la respuesta máxima y  $n$  es el coeficiente de Hill.

Las curvas obtenidas en la Parte II de este trabajo fueron ajustadas con la suma de varias ecuaciones de Hill:

$$I = \sum_{j=1}^x \frac{I_{\max j}}{1 + (CE_{50j} / [A])^{n_j}}$$

donde  $x$  es el número de los componentes ajustados. La elección del mejor ajuste se realizó a través del test F. Todos los ajustes se realizaron usando el programa Graph Pad Prism 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## CURVAS DE INHIBICIÓN

Los oocitos fueron preincubados con las toxinas por 10 minutos, previo a la coaplicación con la ACh. Todas las soluciones de toxina contenían seroalbúmina bovina 0.1 mg/ml para reducir la adsorción inespecífica de los péptidos al plástico de las tubuladuras. La concentración de agonista (ACh) aplicada fue cercana a la  $CE_{50}$  correspondiente a cada subtipo de nAChR estudiado:  $\alpha 9\alpha 10$ , 10  $\mu$ M;  $\alpha 7$ , 100  $\mu$ M;  $\alpha 3\beta 2$ , 10  $\mu$ M;  $\alpha 3\beta 4$ , 100  $\mu$ M;  $\alpha 4\beta 2$ , 10  $\mu$ M;  $\alpha 2\beta 4$ , 100  $\mu$ M;  $\alpha 2\beta 2$ , 100  $\mu$ M;  $\alpha 4\beta 4$ , 100  $\mu$ M;  $\alpha 1\beta 1\gamma 2$  GABA<sub>A</sub>, 30  $\mu$ M y 5HT<sub>3A</sub>, 10  $\mu$ M.

Se usó la amplitud promedio de tres respuestas control a ACh, realizadas justo antes de la exposición a la toxina, para normalizar la amplitud de las respuestas obtenidas en presencia de la misma. Las curvas de inhibición fueron ajustadas con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ respuesta} = 100 / (1 + ([\text{toxina}] / CI_{50})^n)$$

donde  $CI_{50}$  es la concentración de antagonista que produce un bloqueo del 50% de la respuesta control a ACh y  $n$  es el coeficiente de interacción asociado.

## CURVAS DE CORRIENTE – POTENCIAL

Para obtener las curvas corriente vs. 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  $-120$  a  $+50$  con una duración de 2 segundos, partiendo de un potencial de sostén ( $V_{\text{sostén}}$ ) de  $-70$  mV. Las rampas se efectuaron durante la aplicación de ACh, 10 s luego de observado el pico de la respuesta. La corrección de las corrientes de fuga se realizó mediante la sustracción digital de una curva I-V obtenida mediante la aplicación de una rampa de voltaje previo a la aplicación de ACh.

## EVALUACIÓN DE LA PERMEABILIDAD AL $\text{Ca}^{2+}$

Para evaluar la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ , todos los cationes monovalentes fueron reemplazados por el catión no permeante N-metil-D-glucamina (NMG) con el fin de potenciar el posible desplazamiento en el potencial de reversión ( $E_{\text{rev}}$ ) al cambiarse las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Para ello, se utilizó la siguiente solución salina: NMG 120 mM, KCl 2.5mM,  $\text{CaCl}_2$  0.2 a 5 mM, HEPES 10 mM, pH 7.2.

Se realizaron curvas I-V mediante la aplicación de rampas de voltaje (de  $-120$  a  $+50$  mV en 2 s), durante la fase de meseta de las respuestas producidas por una concentración de ACh cercana a la  $\text{CE}_{50}$  respectiva a cada receptor mutante (9', 0.5; 13', 0.2; 17', 1  $\mu\text{M}$ ), desde un  $V_{\text{sostén}}$  de  $-70$  mV, en presencia de distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (0.2, 2 y 5 mM).

La permeabilidad relativa de iones divalentes a monovalentes ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{monovalentes}}$ ) fue calculada mediante la ecuación de campo constante de voltaje de Hodgkin-Goldman-Katz (GHK) ampliada para incluir cationes divalentes y asumiendo que la permeabilidad a aniones es nula (Lewis, 1979). Se asumió que la contribución de una densidad de carga superficial y las concentraciones internas de  $\text{Ca}^{2+}$  eran despreciables y no se las incluyó en los cálculos. Las concentraciones internas de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  usadas en los cálculos fueron de 20 y 150 mM, respectivamente. Los cocientes de permeabilidades fueron calculados para cada oocito y luego promediados. Bajo nuestras condiciones experimentales y suposiciones,  $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$  se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$E_{rev} = RT / F * \ln (4 * P'Ca * [Ca]_e / ([Na]_i + P_K / P_{Na} * [K]_i))$$

donde  $P'Ca = (P_{Ca}/P_{Na}) / (1 + \exp(F/RT * E_{rev}))$ ; R es la constante de los gases, F es la constante de Faraday, T es la temperatura absoluta,  $[Ca]_e$  es la concentración extracelular de  $Ca^{2+}$ ,  $[Na]_i$  y  $[K]_i$  son las concentraciones internas de  $Na^+$  y  $K^+$ , respectivamente.

## REGISTROS DE CANAL ÚNICO

Los registros de canal único se realizaron en las configuraciones de *cell-attached* y *outside-out* (Hamill et al., 1981) a 20°C. Antes de realizar los experimentos los oocitos fueron incubados en BAPTA-AM 100  $\mu$ M por 3hs. La membrana vitelina se removió con fórceps justo antes del experimento. Las soluciones del baño y de la pipeta contenían: NaCl 150 mM,  $CaCl_2$  0.5 mM, KCl 5.6 mM y HEPES 10 mM (pH 7.4). Se usaron soluciones sin  $Mg^{2+}$  y con bajo  $Ca^{2+}$  para evitar el bloqueo de los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  (Weisstaub et al., 2002). Las pipetas se obtuvieron a partir de capilares Kimax (Kimble, Vineland, NJ), se pintaron con Silgard (Dow Corning, Midland, MI) y tenían resistencias de 5 a 7 M $\Omega$ . La ACh se agregó a la solución de la pipeta.

El potencial de reposo de los oocitos en la solución de registro fue de -30 a -50 mV. Las corrientes se registraron usando un amplificador Axopatch 200B (Axon Instr. Corp., Union City, CA), fueron digitalizadas a intervalos de 5  $\mu$ s con una interfase PCI-611E (National Instruments, Austin, TX), grabadas al disco rígido de una computadora usando el programa Acquire (Bruyton Corp., Seattle, WA), y detectadas mediante el programa TAC 4.0.10 (Bruyton Corp., Seattle, WA), a una amplitud de banda de 8 kHz (Bouzat et al., 1994; Bouzat et al., 2002). Los histogramas de tiempo medio de estado abierto se graficaron usando escala logarítmica en las abscisas y la raíz cuadrada de las ordenadas, y fueron ajustados a la suma de cuadrados usando el programa TACfit (Bruyton Corp., Seattle, WA).

La significancia estadística de los registros de canal único fue evaluada usando el test t de Student (dos colas, muestras no apareadas). Las comparaciones múltiples se realizaron con ANOVA seguida del test de Tukey. Los valores de  $p < 0.05$  fueron

considerados significativos.

## **DROGAS UTILIZADAS**

Las siguientes drogas fueron adquiridas de Sigma Chemical Co. (EE.UU.): Cloruro de acetilcolina, cloruro de colina, cloruro de d-tubocurarina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, sulfato de atropina, metilbromuro de (-)-bicuculina y BAPTA-AM.

Las siguientes drogas fueron adquiridas de RBI (EE.UU.): cloruro de ICS 205,930, di-d-tartrato de (-)-nicotina, cloruro de (+)-muscarina, clorhidrato de estricnina, hidrocloreuro de 5-hidroxitriptamina.

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  $-20^{\circ}\text{C}$ .

El BAPTA-AM se disolvió en DMSO a una concentración de 100 mM y se guardó en alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las alícuotas se diluyeron 1000 veces en solución salina en el momento de incubar los ovocitos.

# **PARTE I**

## **LA COMPUERTA DEL nAChR $\alpha 9\alpha 10$ : EL PAPEL DE LOS ANILLOS DE RESIDUOS HIDROFÓBICOS DEL DOMINIO TRANSMEMBRANAL TM2**

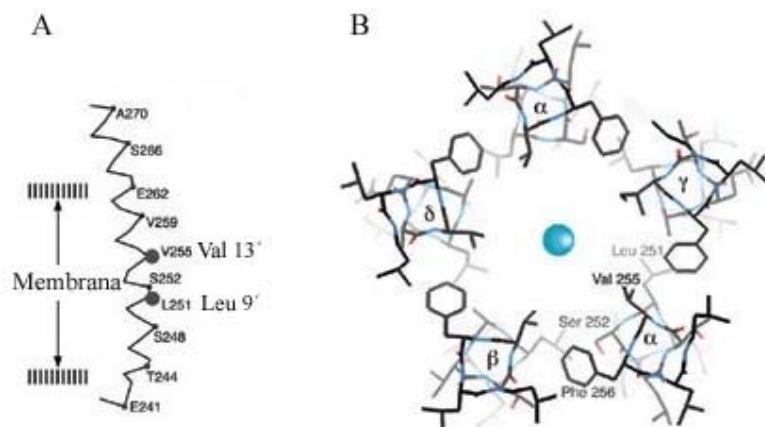
## INTRODUCCIÓN

Los nAChRs pertenecen a la superfamilia de canales iónicos activados por ligando con asa de cisteínas, que incluye a los receptores GABA tipo A y C, glicinérgicos, serotoninérgicos tipo 3 (5-HT<sub>3</sub>) y algunos glutamatérgicos de invertebrados (Le Novere y Changeux, 1995b). Son proteínas alostéricas integrales de membrana, constituidas por cinco subunidades que se ensamblan para formar un canal iónico cuya actividad está modulada por la unión del neurotransmisor. Cada subunidad tiene un dominio N-terminal extracelular, cuatro pasos transmembranales (TM1-TM4) y un dominio C-terminal extracelular. Las cinco subunidades se disponen espacialmente alrededor del poro, quedando los TM2 como paredes del canal. La ubicación de la compuerta del canal, así como la determinación de los residuos involucrados en el proceso alostérico desencadenado por la unión del agonista y su transducción en la apertura del canal (*gating*), han sido objeto de numerosos estudios realizados sobre distintos miembros de esta superfamilia arrojando evidencias que en muchos casos se contraponen. Mediante la metodología de rastreo por accesibilidad de cisteínas (SCAM) se ha sugerido que en el nAChR muscular, la compuerta se ubicaría en el extremo citoplasmático del TM2 (Akabas et al., 1994; Wilson y Karlin, 1998), mientras que en el caso del receptor 5-HT<sub>3</sub> la ubicación sería en la zona central del mismo dominio (Panicker et al., 2002).

Estudios de mutagénesis de un residuo de leucina altamente conservado entre los miembros de esta superfamilia (Leu 9') han implicado a la zona central del TM2 en el *gating* de los receptores nicotínicos (Filatov y White, 1995; Labarca et al., 1995; Revah et al., 1991) y GABA tipo A y C (Chang y Weiss, 1999; 1998). Mediante la misma técnica, se ha puesto en evidencia la participación de la valina (Val) 13' del TM2 en el *gating* del nAChR  $\alpha 7$  (Corringer et al., 1999; Galzi et al., 1992). Existen evidencias de que los residuos 12' del TM2 del nAChR muscular contribuyen de manera independiente y asimétrica al *gating* del canal. Por ejemplo, mutaciones en  $\delta 12'$  afectan en mayor grado al *gating* que las mismas mutaciones en  $\alpha 12'$  o  $\beta 12'$  (Grosman y Auerbach, 2000b). Más aún, estudios de canal único realizados sobre estas mutantes en ausencia de ligando sugieren que la mutación de los residuos 12' afecta principalmente la isomerización abierto-cerrado y no tiene ningún efecto sobre la constante de afinidad del ligando por el receptor (Grosman y Auerbach, 2000c). Por

otro lado, estudios de mutagénesis del esqueleto hidrocarbonado sugieren que residuos ubicados en la zona central hacia la extracelular del TM2 (13', 16', 19') estarían involucrados en el proceso de *gating* del canal (England et al., 1999).

El uso de la determinación de constantes de equilibrio de energía libre, ha permitido proponer que las hélices  $\alpha$  del dominio TM2 del nAChR muscular giran y se doblan sobre sus residuos centrales durante el *gating* del canal, acompañando un cambio conformacional que se inicia en la porción extracelular del TM2 y se propaga hacia la intracelular (Cymes et al., 2002). El modelo atómico de 4Å de resolución del poro cerrado del nAChR presente en la raya *Torpedo*, propone que la compuerta es un cinturón hidrofóbico constrictor del poro que involucra a los residuos Leu 9' y Val 13' del TM2 (Miyazawa et al., 2003). Dicho estudio sugiere que la zona central del poro presenta propiedades especiales: es la zona de mayor constricción y es simétrica, permitiendo interacciones hidrofóbicas entre superficies equivalentes de residuos homólogos. Estas interacciones ocurren en dos zonas: una que involucra a la Leu 9' con la serina (Ser) 10' de la subunidad vecina y la otra a la Val 13' con la fenilalanina (Phe) 14' vecina (Figura7).



**Figura 7** A, Hélice TM2 que muestra los residuos que dan a la luz del poro. B, Se muestra el arreglo simétrico de las cadenas laterales de los residuos formadores de la compuerta. La esfera en el centro del poro es del tamaño de un ion sodio. Dicho ion hidratado quedaría atrapado en esta región.

Estas interacciones simétricas harían que las cadenas laterales de los residuos vecinos se acerquen lo suficiente como para generar una constricción del poro tal que la distancia radial desde el centro del poro sea cercana a 3Å, demasiado pequeña para permitir el paso de un ion sodio o potasio hidratado. De esa forma, el cinturón hidrofóbico generaría una barrera energética para el flujo iónico a través del canal.

Dado que no existiría otra barrera a lo largo del poro, se propuso a esta región como la compuerta del canal. Durante la activación del receptor, las rotaciones transmitidas desde el dominio extracelular a las hélices TM2 debilitarían estas interacciones hidrofóbicas, provocando la apertura de la compuerta del canal.

Beckstein y colaboradores generaron simulaciones dinámicas sobre un modelo de los TM2 del nAChR muscular y arribaron a la conclusión de que la constricción presente en la mitad de dichos dominios forma una compuerta hidrofóbica, la cual genera una barrera energética al paso de los iones (comunicación personal). El cinturón de residuos hidrofóbicos actuaría como barrera ya que genera un diámetro de poro lo suficientemente pequeño como para que un ion deba deshacerse de varias moléculas de agua de su escudo de hidratación para atravesarlo. Como dicho proceso requiere un gasto energético elevado, el paso del ion resulta energéticamente desfavorable y por ende bloqueado. Esta barrera es efectiva únicamente si las moléculas de agua del escudo de solvatación no pueden ser temporariamente reemplazadas por grupos polares de las cadenas laterales o del esqueleto de la proteína. El modelo propuesto por estos autores sugiere que la barrera para un ion sodio se extiende desde la Leu 9' hasta la Val 17', y que la zona de mayor impedimento energético coincide con la Val 13'.

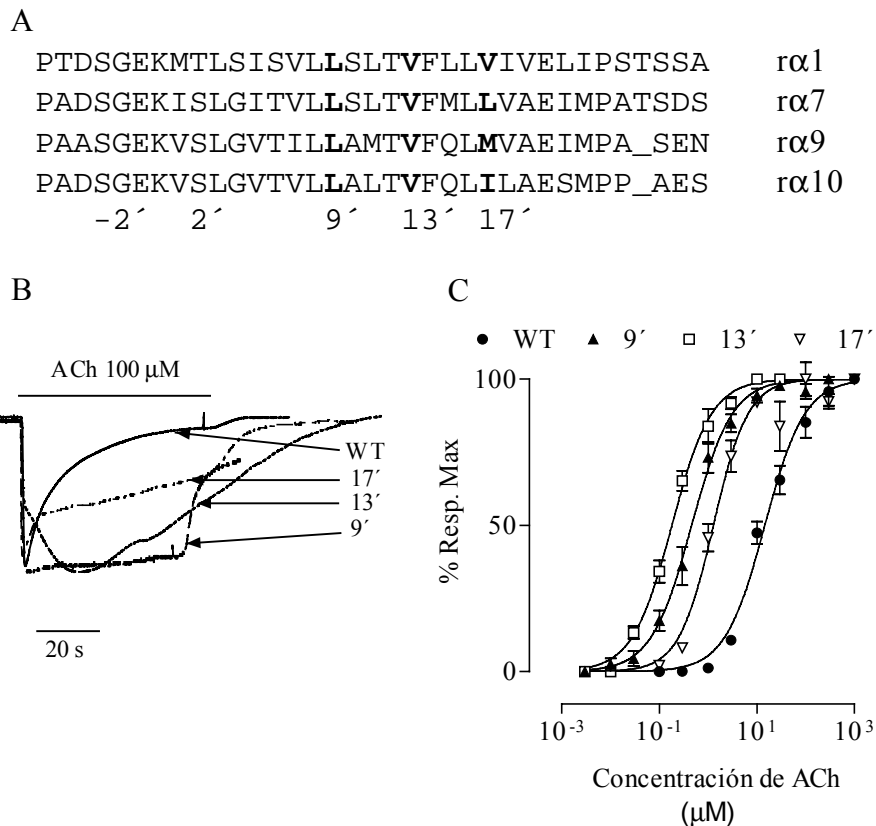
Entre los miembros de la familia de subunidades de nAChRs,  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  son los que han sido clonados más recientemente (Elgoyhen et al., 1994; Elgoyhen et al., 2001), y constituyen una nueva subfamilia filogenética. Los nAChRs constituidos por estas subunidades presentan una farmacología muy particular: su perfil es mixto nicotínico-muscarínico, comparten propiedades con los receptores GABA<sub>A</sub>, glicinérgicos y 5-HT<sub>3</sub>, y lo más sobresaliente es que la nicotina, agonista prototípico de la familia, no lo activa. Debido a su baja conservación y a sus propiedades peculiares, resulta necesario evaluar si alguno de los residuos que en otros miembros de la familia han sido remarcados como fundamentales en el *gating* y en la formación de la compuerta, también lo son en el caso del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$ . Para responder este interrogante, hemos seguido estrategias similares a las usadas para otros receptores. Hemos realizado un estudio de mutagénesis sitio específica de tres anillos de residuos hidrofóbicos (17', 13' y 9') del TM2 del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$ , los cuales darían hacia el lumen del canal en una organización estratificada de las hélices  $\alpha$  del mismo (Bertrand et al., 1993b; Karlin y Akabas, 1995; Miyazawa et al., 2003).



## RESULTADOS

### Los receptores mutantes exhiben una disminución en sus cinéticas de desensibilización y un incremento en sus afinidades aparentes por ACh

La Figura 8A muestra una alineación de las secuencias correspondientes a los dominios TM2 de diferentes nAChRs. Los residuos que fueron mutados a treonina corresponden a tres anillos de residuos hidrofóbicos (17', 13' y 9'), de los cuales se ha propuesto que mirarían hacia el lumen del canal en una organización estratificada de las hélices  $\alpha$  del mismo (Bertrand et al., 1993b; Karlin y Akabas, 1995; Miyazawa et al., 2003). Los residuos fueron mutados a treonina ya que dicho cambio produce alteraciones fenotípicas drásticas en otros canales activados por ligando (Bertrand et al., 1992; Chang y Weiss, 1998; Labarca et al., 1995).



**Figura 8 A**, Alineación de las secuencias aminoácidas de las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  de rata. Los residuos mutados se muestran en negrita. **B**, Respuestas representativas de los receptores salvaje (WT) y mutantes, a la aplicación de ACh 100  $\mu$ M por 1 minuto. **C**, Curvas concentración respuesta a ACh. Las respuestas fueron normalizadas y referidas a las respuestas máximas a ACh, en cada caso. Se muestra la media y el error estándar de 4 - 5 experimentos por grupo.

En primer lugar se examinaron las respuestas macroscópicas evocadas por ACh en oocitos de *Xenopus* que expresaban receptores salvajes o mutantes. La expresión de las subunidades mutantes generó nAChRs funcionales que responden a la ACh (Figuras 8B, C). Las amplitudes máximas de las respuestas obtenidas en las dobles mutantes ( $\alpha 9^* \alpha 10^*$ ) fueron similares a las obtenidas en el receptor salvaje, con la excepción de la mutante 9', donde se observó una reducción de ese parámetro (Tabla 2).

Los receptores mutantes exhibieron una disminución en sus tasas de desensibilización, obtenidas tras la aplicación prolongada de concentraciones saturantes de ACh (Figura 8B). La tasa de desensibilización fue estimada como el porcentaje de la corriente máxima remanente luego de la aplicación de ACh 100  $\mu$ M por 30 segundos (Tabla 2). Cabe destacar que mientras que en el receptor salvaje la remoción de ACh produjo un rápido decaimiento de la amplitud de la corriente, en el caso de la mutante 13' se observó una corriente residual significativa que perduró por varios segundos después del lavado del agonista (Figura 8B).

Se realizaron CCR a ACh para todos los nAChRs mutantes (dobles y simples mutantes), y se obtuvieron las concentraciones efectivas 50 ( $CE_{50}$ ) y los coeficientes de Hill (nH) respectivos (Tabla 2). En el caso de las doble mutantes, las mutaciones provocaron un incremento en la sensibilidad a ACh, sin cambios en el nH, evidenciado por el corrimiento de las CCR a ACh hacia concentraciones más bajas del agonista (Figura 8C y Tabla 2). El orden de potencia para ACh fue: 13' > 9' > 17' ( $p < 0.05$ ), observándose el mayor corrimiento en la afinidad aparente a ACh (86 veces) en la mutante 13'. Este efecto, aunque en menor grado, también se observó en receptores donde sólo una de las subunidades estaba mutada (mutantes simples). Sin embargo, al comparar los valores de las  $CE_{50}$  de las mutantes simples en las posiciones 9' y 13', no se observaron diferencias, sugiriendo que en esas posiciones ambos tipos de subunidades contribuyen de manera asimétrica y no aditiva a la funcionalidad del pentámero (ver discusión). Por otro lado, en las mutantes simples 17' se observaron diferencias, siendo mayor el corrimiento al mutar la subunidad  $\alpha 10$ .

**Tabla 2. Propiedades de los receptores mutantes**

	$I_{M\acute{a}x}$ (nA)	$I_{30\text{ seg}}/I_{M\acute{a}x}$ (%)	$CE_{50}$ ( $\mu$ M)	n Hill
$\alpha 9 \alpha 10$	600 ± 100 (40)	16 ± 3 (11)	14.6 ± 5.3 (5) <sup>c</sup>	1.1 ± 0.1
L9'T				
$\alpha 9^* \alpha 10$	547 ± 145 (30)	89 ± 2 (12)	5.30 ± 0.32 (8)	1.7 ± 0.1
$\alpha 9 \alpha 10^*$	155 ± 35 (12) <sup>a</sup>	88 ± 5 (6)	5.62 ± 0.40 (8)	1.8 ± 0.2
$\alpha 9^* \alpha 10^*$	235 ± 40 (22) <sup>a</sup>	92 ± 2 (12)	0.46 ± 0.04 (5) <sup>c</sup>	1.1 ± 0.1
V13'T				
$\alpha 9^* \alpha 10$	632 ± 269 (5)	80 ± 6 (8)	0.42 ± 0.02 (5)	1.1 ± 0.1
$\alpha 9 \alpha 10^*$	237 ± 77 (10)	91 ± 2 (8)	0.46 ± 0.02 (5)	1.4 ± 0.1
$\alpha 9^* \alpha 10^*$	531 ± 116 (16)	74 ± 4 (23)	0.17 ± 0.01 (5) <sup>c</sup>	1.1 ± 0.1
M/I17'T				
$\alpha 9^* \alpha 10$	101 ± 12 (15) <sup>b</sup>	80 ± 1 (18)	5.47 ± 0.71 (5)	1.2 ± 0.2
$\alpha 9 \alpha 10^*$	660 ± 281 (15)	73 ± 3 (9)	2.86 ± 0.60 (9)	1.1 ± 0.2
$\alpha 9^* \alpha 10^*$	430 ± 67 (10)	67 ± 3 (11)	1.09 ± 0.13 (4) <sup>c</sup>	1.5 ± 0.2

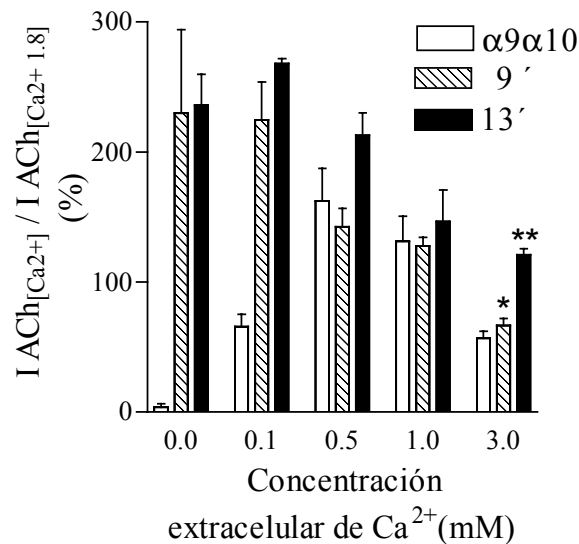
a:  $p < 0.05$ , b:  $p < 0.01$  con respecto al receptor salvaje, test  $t$  de Student. c:  $wt > 17' > 9' > 13'$ ,  $p < 0.05$ , ANOVA seguida del test de Tukey.

### **La modulación alostérica mediada por el ion $Ca^{2+}$ extracelular se encuentra reducida en los receptores mutantes**

Los iones divalentes modulan la actividad de varios nAChRs. El receptor  $\alpha 9 \alpha 10$  es altamente permeable al  $Ca^{2+}$  y su actividad está modulada de manera bifásica por el  $Ca^{2+}$  extracelular: se observa potenciación a concentraciones micromolares y bloqueo a concentraciones milimolares (Weisstaub et al., 2002). La potenciación es independiente del voltaje y se evidencia por un incremento en la afinidad aparente por la ACh, sugiriendo que el  $Ca^{2+}$  interacciona con sitios alostéricos extracelulares para modular el acople entre la unión del agonista y el *gating* del canal. El bloqueo, en cambio, es dependiente del voltaje, sugiriendo que el o los sitios de acción del  $Ca^{2+}$  se

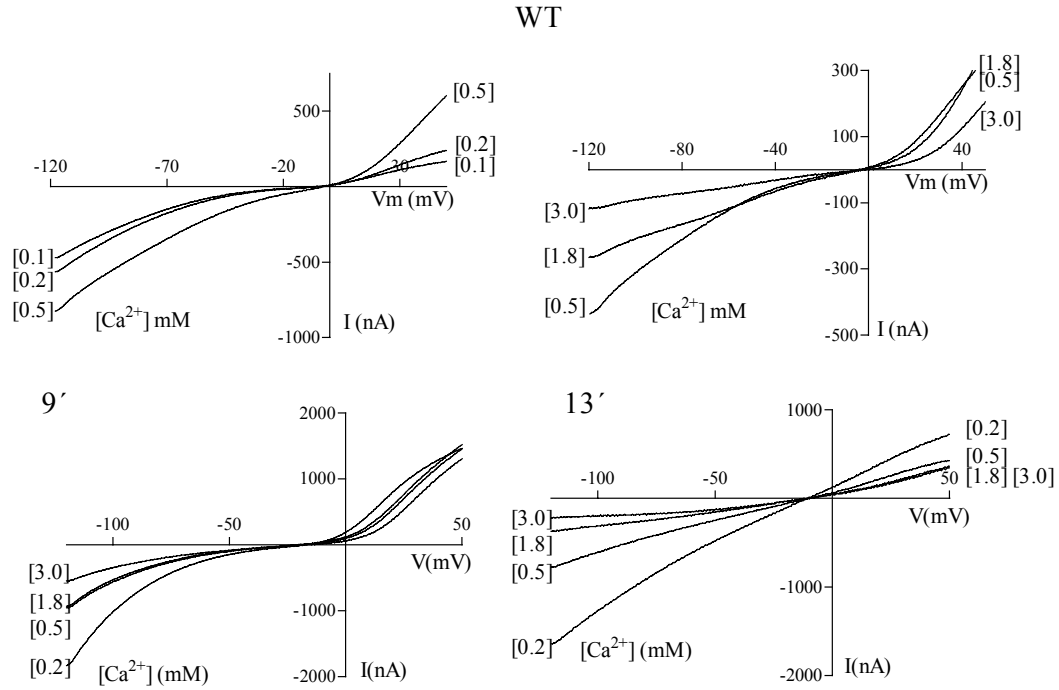
encontrarían en el poro del canal, y resultaría del proceso de permeación (Katz et al., 2000).

El diagrama de barras de la Figura 9 muestra las respuestas producidas por una concentración fija de ACh obtenida a distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, para los receptores salvaje y mutantes 9' y 13' a un potencial de membrana de -90 mV. La concentración de ACh usada en cada caso fue cercana a la  $\text{CE}_{50}$  correspondiente, obtenida de las CCR de la Figura 8, y las respuestas fueron normalizadas a las obtenidas en  $\text{Ca}^{2+}$  1.8 mM. Al igual que lo reportado anteriormente, las respuestas del receptor salvaje a ACh fueron potenciadas por concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  de hasta 0.5 mM, y bloqueadas por concentraciones mayores del ion (Weisstaub et al., 2002). En el caso de las mutantes 9' y 13' el efecto potenciador estuvo ausente, sugiriendo que el *gating* del canal por ACh es independiente de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que el efecto bloqueante persistió. Sin embargo, la magnitud del bloqueo por  $\text{Ca}^{2+}$  en la mutante 13' resultó menor que el presente en la mutante 9', como se evidencia al comparar el porcentaje de la respuesta a  $\text{Ca}^{2+}$  3 mM respecto de la obtenida a  $\text{Ca}^{2+}$  0.1 mM: 9',  $29 \pm 2\%$  y 13',  $51 \pm 2\%$ ,  $n=4$ ,  $p<0.001$ .



**Figura 9** Diagrama de barras que ilustra los efectos del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular sobre las respuestas a ACh en los receptores salvaje y mutantes a un potencial de membrana de -90 mV. La concentración de ACh usada en cada caso fue cercana a la  $\text{CE}_{50}$  obtenida de las CCR de la Figura 8:  $10\mu\text{M}$  para  $\alpha 9\alpha 10$ ,  $0.5\mu\text{M}$  para 9' y  $0.1\mu\text{M}$  para 13'. Las amplitudes de las corrientes obtenidas a las diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , en cada oocito, fueron normalizadas respecto a las obtenidas a  $\text{Ca}^{2+}$  1.8 mM. Cada barra representa la media y el error estándar de las respuestas normalizadas obtenidas en distintos oocitos ( $n= 4$  a 10 por barra). \* $p<0.05$  respecto al valor correspondiente a  $\text{Ca}^{2+}$  0.1 mM, \*\* $p<0.05$  respecto al valor correspondiente a  $\text{Ca}^{2+}$  0 mM.

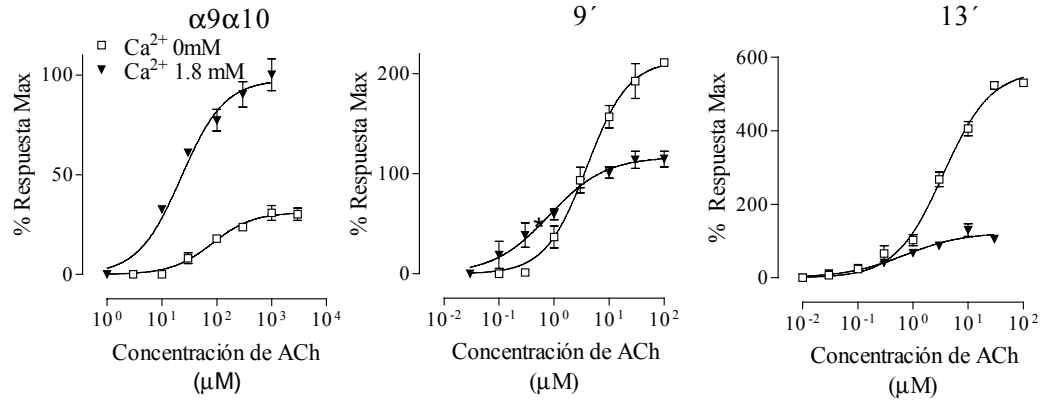
La Figura 10 muestra curvas de intensidad de corriente versus voltaje de membrana (curvas I-V) para los receptores salvaje y mutantes 9' y 13', obtenidas tras la aplicación de rampas de voltaje de 2 segundos de duración (-120 a +50 mV), 10 segundos después de obtener la respuesta máxima a ACh, a diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Los potenciales de reversión aparentes ( $E_{\text{rev}}$ ) obtenidos a  $\text{Ca}^{2+}$  1.8 mM para el receptor salvaje ( $-11.1 \pm 1.3$ , n=5, Elgoyhen et al., 2001) y para los receptores mutantes 9' ( $-16 \pm 4$ , n=6) y 13' ( $-9 \pm 3$ , n=6) no resultaron significativamente diferentes. La mutante 9' mostró una marcada rectificación cerca del  $E_{\text{rev}}$ , similar a la reportada para el receptor salvaje (Elgoyhen et al., 2001; Weisstaub et al., 2002). En contraste, en la mutante 13' se obtuvieron curvas I-V casi lineales. A diferencia de lo anteriormente descrito para el receptor salvaje, los receptores mutantes presentaron respuestas cuyas amplitudes disminuían al aumentar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, a todas las concentraciones del ion estudiadas (Figura 10). Este resultado es consistente con el reportado en la Figura 9, e indicaría que mientras la potenciación está ausente en las mutantes, el bloqueo persiste. En la mutante 9', el bloqueo por  $\text{Ca}^{2+}$  resultó dependiente del voltaje, donde no se observó bloqueo a potenciales mayores a 0 mV. En cambio, en el caso de la mutante 13', si bien el bloqueo por  $\text{Ca}^{2+}$  resultó dependiente del voltaje, dicha dependencia fue menor. Esto puede evidenciarse al comparar las relaciones entre las amplitudes de las corrientes obtenidas a  $\text{Ca}^{2+}$  3 mM respecto de las obtenidas a  $\text{Ca}^{2+}$  0.2 mM a -110 mV y a +40 mV, respectivamente: 9',  $0.31 \pm 0.08$  y  $0.98 \pm 0.05$ , n=6; 13',  $0.27 \pm 0.09$  y  $0.59 \pm 0.10$ , n=6.



**Figura 10**, Curvas I-V representativas obtenidas tras la aplicación de una rampa de voltaje (-120 a +50 mV, 2 segundos) 10 s después del pico de la respuesta a ACh 10  $\mu$ M para el receptor salvaje, 0.5  $\mu$ M para 9' (n=6) y 0.1  $\mu$ M para 13' (n=6). El potencial de membrana de los oocitos fue fijado a -70 mV y las rampas se realizaron a distintas concentraciones de  $Ca^{2+}$  extracelular.

El diagrama de barras de la Figura 9 muestra el efecto del  $Ca^{2+}$  extracelular a una sola concentración de ACh. Con el objeto de analizar si la potenciación por  $Ca^{2+}$  está ausente a todas las concentraciones de agonista, se realizaron CCR para ACh a  $Ca^{2+}$  extracelular 0 mM nominal y 1.8 mM (Figura 11). En todos los casos las respuestas fueron normalizadas a la máxima respuesta obtenida a  $Ca^{2+}$  1.8 mM. El nAChR salvaje presentó potenciación por  $Ca^{2+}$  de las respuestas producidas por ACh a todas las concentraciones del agonista evaluadas. La máxima respuesta alcanzada a  $Ca^{2+}$  0 nominal fue  $31 \pm 2\%$  de la obtenida a  $Ca^{2+}$  1.8 mM, y se observó una disminución en la potencia sin cambios en el nH ( $Ca^{2+}$  0 nominal:  $CE_{50}$ ,  $83.1 \pm 9.2 \mu$ M; n Hill,  $1.2 \pm 0.3$ , n=5;  $Ca^{2+}$  1.8 mM,  $CE_{50}$ ,  $22.6 \pm 2.4 \mu$ M; n Hill,  $1.1 \pm 0.2$ , n=5). En el caso de la mutante 9', las respuestas fueron potenciadas por el  $Ca^{2+}$  a concentraciones de ACh menores a 1  $\mu$ M y bloqueadas a concentraciones mayores de agonista. El efecto potenciador fue significativo a una concentración de ACh de 0.3  $\mu$ M, donde las respuestas a  $Ca^{2+}$  0 nominal fueron  $1.3 \pm 0.4\%$  (n=5) y a  $Ca^{2+}$  1.8 mM  $38.7 \pm 12.3\%$  (n=5) respecto de la máxima obtenida a  $Ca^{2+}$  1.8 mM. De manera diferente, en la

mutante 13' se observó una ausencia de la potenciación por  $\text{Ca}^{2+}$  a todas las concentraciones de ACh evaluadas, evidenciándose únicamente el bloqueo de las respuestas producidas por ACh en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.

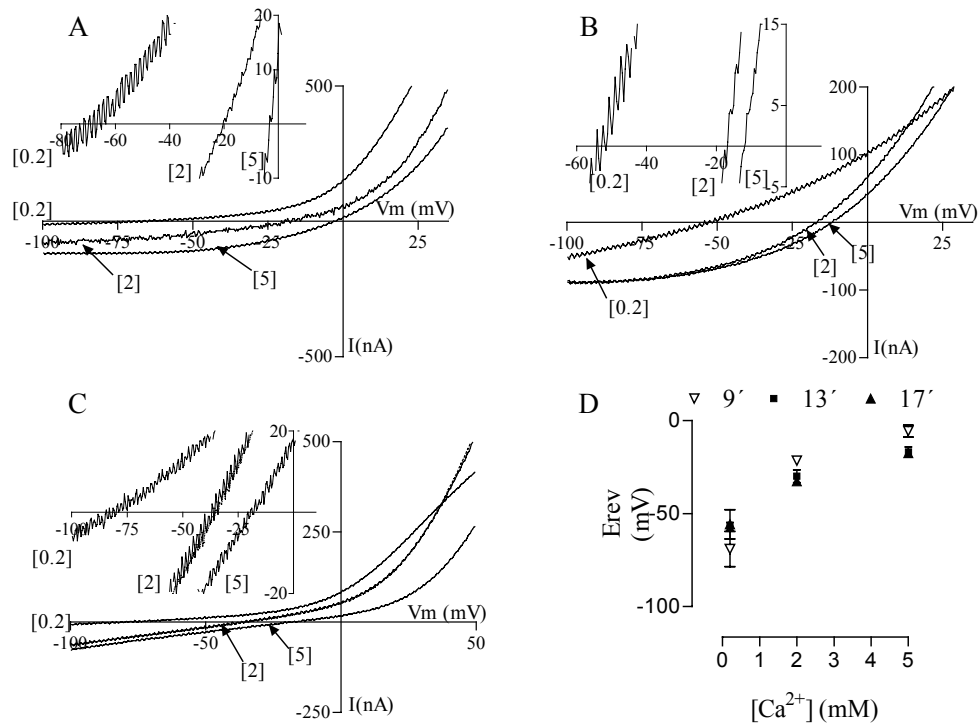


**Figura 11** CCR para ACh realizadas a  $\text{Ca}^{2+}$  0 nominal o a  $\text{Ca}^{2+}$  1.8 mM, para cada caso. Se muestra la media y el error estándar de 4 a 10 experimentos por grupo.

### La permeabilidad al $\text{Ca}^{2+}$ extracelular no se encuentra modificada en los receptores mutantes

Los nAChRs son permeables a cationes monovalentes como el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{K}^+$  y a divalentes como el  $\text{Ca}^{2+}$  (Bertrand et al., 1993a; Decker y Dani, 1990; Mulle et al., 1992a; Mulle et al., 1992b; Séguéla et al., 1993; Vernino et al., 1992; Vernino et al., 1994). Se los puede dividir en tres categorías teniendo en cuenta la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  relativa a la de  $\text{Na}^+$  ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ ). El nAChR muscular es el menos permeable (Decker y Dani, 1990; Vernino et al., 1994), los receptores neuronales heteroméricos presentan una permeabilidad mayor (Fieber y Adams, 1991; Sands y Barish, 1991; Vernino et al., 1992; Vernino et al., 1994) y los homoméricos  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$  y  $\alpha 9$  junto con el heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  tienen la mayor permeabilidad relativa al  $\text{Ca}^{2+}$  (Bertrand et al., 1993a; Katz et al., 2000; Sands y Barish, 1991; Séguéla et al., 1993; Weisstaub et al., 2002). Estudios realizados con el nAChR  $\alpha 7$  evidenciaron que los residuos 9' del TM2 estarían involucrados en la alta permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  (Fucile et al., 2000). Con el fin de evaluar si la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  es modificada por las mutaciones 9', 13' o 17', se realizaron curvas I-V mediante la aplicación de rampas de voltaje (de  $-120$  a  $+50$  mV en 2 s), durante la fase de meseta de las respuestas producidas por una

concentración de ACh cercana a la  $CE_{50}$  respectiva (9': 0.5, 13': 0.2, 17': 1  $\mu$ M), desde un  $V_{sostén}$  de  $-70$  mV, en presencia de distintas concentraciones de  $Ca^{2+}$  extracelular. Todos los cationes monovalentes fueron reemplazados por el catión impermeable N-metil-D-glucamina (NMG) con el fin de potenciar el posible desplazamiento en el potencial de reversión ( $E_{rev}$ ) al cambiarse las concentraciones de  $Ca^{2+}$  extracelular (Figura 12A-C).



**Figura 12 Permeabilidad relativa al  $Ca^{2+}$  de los receptores mutantes.** Curvas I-V representativas obtenidas en oocitos que expresan los receptores mutantes, mediante la aplicación de rampas de voltaje (de  $-120$  a  $+50$  mV en 2 s), durante la fase de meseta de las respuestas producidas por una concentración de ACh cercana a la  $CE_{50}$  correspondiente a cada receptor (A, 9'; B, 13'; C, 17'). Los oocitos fueron bañados con una solución salina que contenía NMG como único catión monovalente y diferentes concentraciones de  $CaCl_2$ . Se muestran las mismas curvas I-V amplificadas alrededor de sus  $E_{rev}$  para una mejor visualización de los corrimientos de dicho parámetro. D, Gráficos de  $E_{rev}$  en función de la concentración extracelular de  $Ca^{2+}$ .

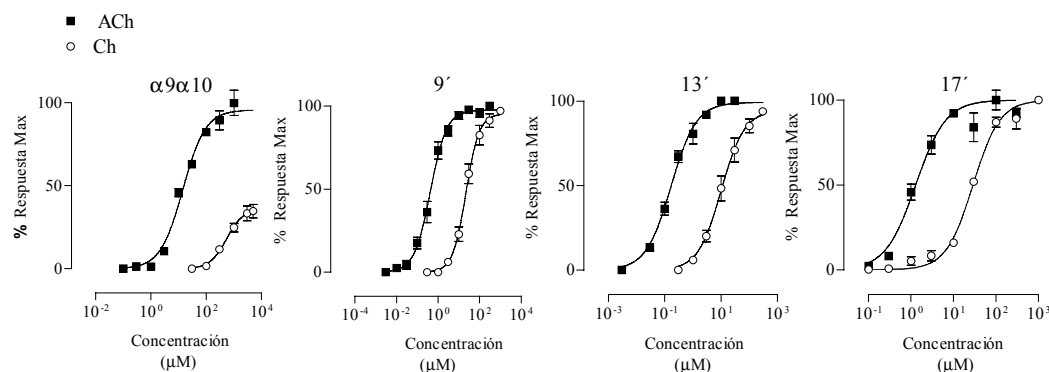
En la Figura 12D se graficaron los valores medios de los  $E_{rev}$  obtenidos en distintos oocitos que expresaban los receptores mutantes, en función de la concentración extracelular de  $Ca^{2+}$  (Katz et al., 2000). Las  $P_{Ca}/P_{Na}$  estimadas mediante la ecuación de GHK ampliada (ver materiales y métodos) muestran que los receptores mutantes conservaron la alta permeabilidad al  $Ca^{2+}$ , reportada anteriormente para el



receptor salvaje ( $P_{Ca} / P_{monovalentes}$ : WT,  $9 \pm 1$ ,  $n=5$  (Weisstaub et al., 2002);  $9'$ ,  $12 \pm 6$ ,  $n=5$ ;  $13'$ ,  $11 \pm 5$ ,  $n=7$ ;  $17'$ ,  $12 \pm 6$ ,  $n=7$ ).

### La colina, un agonista parcial del receptor salvaje, se comporta como agonista total de los receptores mutantes

La colina, el metabolito resultante de la degradación enzimática de la ACh, activa varios nAChRs, incluyendo a los receptores  $\alpha 7$  y  $\alpha 9$  (Papke et al., 1996; Verbitsky et al., 2000).



**Figura 13** CCR a Ch realizadas a  $Ca^{2+}$  1.8 mM. Las respuestas máximas fueron normalizadas respecto de las respuestas máximas a ACh, en cada caso. Se muestra la media y el error estándar de 4 a 7 experimentos por grupo. Los valores de la  $CE_{50}$  y del n Hill se muestran en la Tabla 3.

La Figura 13 muestra CCR a colina, para los receptores salvaje y mutantes, donde las respuestas fueron normalizadas a la máxima obtenida con ACh en cada caso. La colina se comportó como un agonista parcial en el caso del receptor salvaje, con una respuesta máxima a ACh del 36% y una  $CE_{50}$  de 538  $\mu M$  (Tabla 3). En cambio, en el caso de los receptores mutantes, la colina resultó un agonista total, alcanzando respuestas máximas similares a las obtenidas con ACh. De la misma forma que lo reportado para la ACh (Figura 8 y Tabla 2), las mutaciones produjeron un incremento en la sensibilidad a la colina, evidenciado por una reducción en la  $CE_{50}$ . El orden de potencias para la colina entre los receptores mutantes fue:  $13' > 9' > 17'$  ( $p < 0.05$ ). El mayor cambio en la afinidad aparente, 49 veces, fue para la mutante  $13'$ .

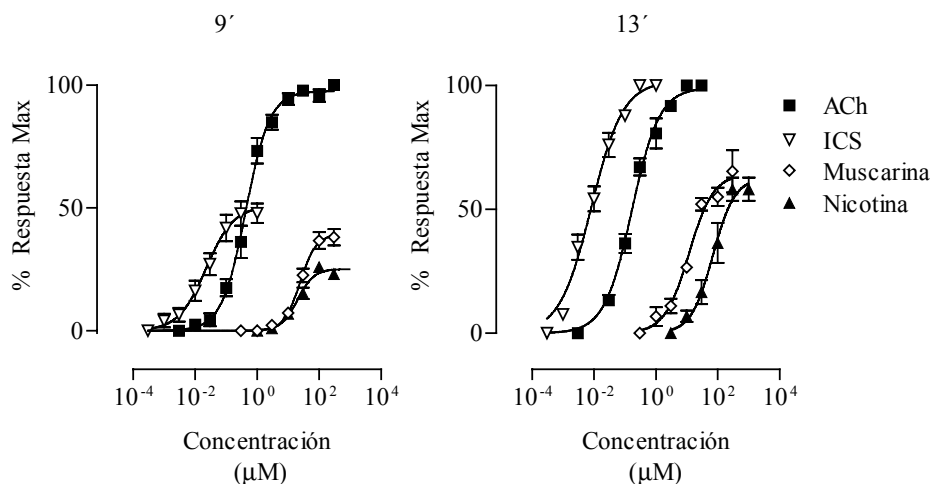
**Tabla 3. Respuestas de los receptores mutantes a diferentes drogas agonistas**

	$\alpha 9\alpha 10$	L9'T	V13'T	M/I17'T
Ch	CE <sub>50</sub> =538 ± 140 μM Resp Max =36 ± 3% n=4	CE <sub>50</sub> =21 ± 2 μM Resp Max =97 ± 3% n=5	CE <sub>50</sub> =10 ± 1 μM Resp Max =98 ± 2% n=7	CE <sub>50</sub> =27 ± 3 Resp Max =94 ± 2% n=4
ICS	CI <sub>50</sub> =0.04 ± 0.01 μM n=4	CE <sub>50</sub> =0.04 ± 0.01 μM Resp Max =49 ± 4% n=8	CE <sub>50</sub> =8.2 ± 0.6 nM Resp Max =98 ± 3% n=7	
Nic	CI <sub>50</sub> =4.6 ± 1.0 μM n=4	CE <sub>50</sub> =20 ± 4 μM Resp Max =25 ± 2% n=6	CE <sub>50</sub> =70 ± 14 μM Resp Max =63 ± 7% n=4	
Musc	CI <sub>50</sub> =40.9 ± 5.1 μM n=5	CE <sub>50</sub> =24 ± 1 μM Resp Ma x =39 ± 3% n=7	EC <sub>50</sub> =12 ± 3 μM Resp Max =60 ± 4% n=7	

### Algunos antagonistas clásicos del receptor salvaje son agonistas de los receptores mutantes

El agonista clásico de los nAChRs, nicotina, y el agonista clásico de los receptores colinérgicos muscarínicos, muscarina, son antagonistas del receptor salvaje  $\alpha 9\alpha 10$ . Más aún, el ICS-205,930, antagonista clásico de los receptores 5-HT<sub>3</sub>, es uno de los antagonistas más potentes del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  (Elgoyhen et al., 2001). Este perfil farmacológico es una característica peculiar y única de los nAChRs  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$ .

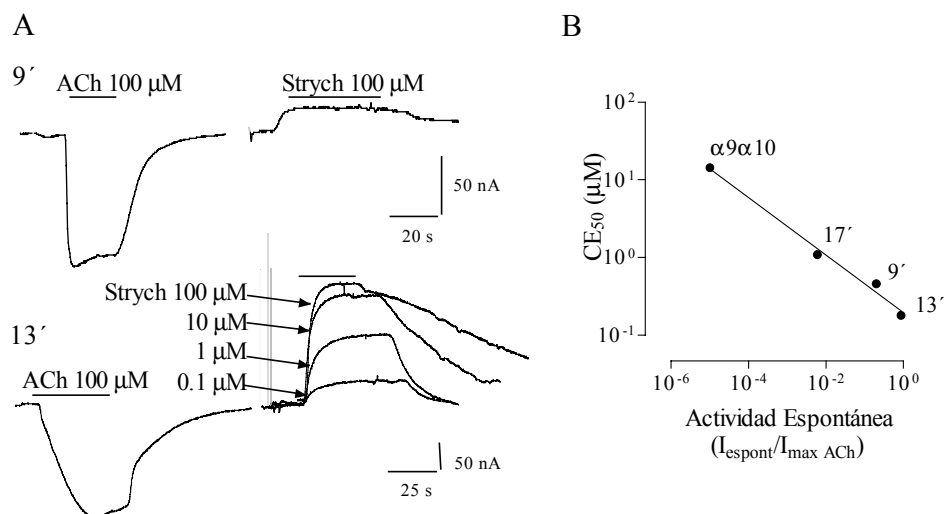
La figura 14 muestra que estas drogas antagonistas del receptor salvaje actúan como agonistas de los receptores mutantes 9' y 13'. Para los tres compuestos, con la mutante 13' se obtuvieron las mayores eficacias (Tabla 3 y Figura 14). Estas tres drogas también resultaron agonistas de la mutante 17', pero las respuestas máximas obtenidas fueron de tan pequeña amplitud (4% de la respuesta máxima a ACh, en el caso de nicotina, n=8) que resultó imposible realizar las CCR correspondientes.



**Figura 14** CCR a ACh, ICS-205,930, muscarina y nicotina realizadas a  $\text{Ca}^{2+}$  1.8 mM. Las respuestas máximas fueron normalizadas respecto de las respuestas máximas a ACh, en cada caso. Se muestra la media y el error estándar de 4 a 8 experimentos por grupo. Los valores de la  $\text{CE}_{50}$  y del n Hill se muestran en la Tabla 3.

### Los receptores mutantes exhiben aperturas espontáneas

Se ha reportado que mutaciones en las posiciones 13' y 9' en el nAChR  $\alpha 7$  inducen aperturas espontáneas del canal (Bertrand et al., 1997; Corringer et al., 1999), evidenciadas como una disminución en la corriente de sostén en la presencia del antagonista competitivo metillicaconitina. En el caso del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$ , antagonistas clásicos que no se comportan como agonistas de los receptores mutantes, como los descritos en la Figura 14, provocaron una deflexión de la línea de base de la corriente en dirección positiva, es decir una reducción de la corriente de sostén (Figura 15A). Este fue el caso de la estricnina, la d-tubocurarina, la atropina, la bicuculina y la serotonina. No se observó ninguna modificación de la corriente de sostén en oocitos no inyectados ni en oocitos que expresaban receptores salvajes. Este resultado puede interpretarse como el cierre de canales que se encuentran abiertos en ausencia del agonista (Bertrand et al., 1997; Corringer et al., 1999).



**Figura 15** **A**, Respuestas representativas (n=5) a estricnina (Strych) en oocitos que expresan los receptores mutantes 9' (panel superior) o 13' (panel inferior). Se muestra una respuesta tipo a ACh 100 μM, para comparar con las anteriores. **B**, Relación entre los valores de CE<sub>50</sub> para ACh, para cada tipo de receptor (Tabla 3) y el grado de actividad espontánea, calculada como el porcentaje de la respuesta máxima a estricnina comparada con la respuesta máxima a ACh (r<sup>2</sup>= 0.989).

La Figura 15A muestra registros representativos de las respuestas producidas por estricnina en los receptores mutantes 9' y 13', incluyendo la respuesta máxima a ACh para cada caso, para comparar. La respuesta máxima a estricnina fue del 87% (n=9), 20% (n=12) y 0.6% (n=5) respecto de la máxima evocada por ACh, en las mutantes 13', 9' y 17', respectivamente. Nuevamente, el fenotipo más drástico fue obtenido con la mutante 13'. Esta observación puede correlacionarse con el hecho de que dicha mutante presentó las corrientes de sostén de mayor amplitud cuando el potencial de membrana fue fijado a -70 mV (α9α10, 77±5 nA, n=55; 9', 65±6 nA, n=55; 13', 600±57 nA, n=55; 17', 60±2 nA, n=40).

El punto medio de la CCR, la CE<sub>50</sub>, es un parámetro empírico que depende de la constante de asociación y disociación del agonista al receptor, como así también de la constante de apertura y cierre del canal (Colquhoun, 1998). Por ello, cambios en la CE<sub>50</sub> de ACh podrían derivar de cambios en las propiedades del *gating* del canal. Los valores de CE<sub>50</sub> obtenidos se correlacionan de manera inversa con el grado de aperturas espontáneas (*gating*) de los canales (Figura 15B). Esto sugeriría que las mutaciones estudiadas generarían una facilitación en el *gating* del canal.

### Los registros de canal único revelan un incremento en el tiempo medio aparente del estado abierto de los receptores mutantes

Con el fin de caracterizar a nivel de canal único las propiedades de los receptores salvaje y mutantes, se realizaron registros electrofisiológicos en la configuración *cell- attached* en oocitos inyectados con las subunidades salvajes y mutantes 9' y 13'.

En primer lugar se estudió la actividad de los canales endógenos de los oocitos. Para ello, se realizaron registros en oocitos no inyectados. En más del 90% de los sellos se detectaron aperturas de canales (Figura 16A), similares a las correspondientes a canales activados por estiramiento (*stretch-activated channels*) anteriormente reportados (Taglietti y Toselli, 1988). El histograma de amplitudes obtenido a un potencial de pipeta de +120 mV, al cual el potencial de membrana es de aproximadamente -150 mV, mostró un único componente de  $7.1 \pm 1.2$  pA (n=3). A potenciales positivos (+70 a +120 mV), la curva I-V resultó lineal. La conductancia, calculada como la pendiente de dicha curva fue de 76 pS. El histograma de tiempos de estado abierto pudo ajustarse con un solo componente de  $730 \pm 170$   $\mu$ s (n=3).

Luego se realizaron registros, en las mismas condiciones que las descritas anteriormente, en oocitos que expresaban los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  (WT) y mutantes 9' y 13'. La concentración de ACh usada fue cercana a la que produce las máximas respuestas macroscópicas en cada receptor. Los registros en oocitos que expresaban el receptor salvaje, obtenidos en presencia de ACh 60  $\mu$ M, presentaron una nueva población de canales, que nunca fueron observados ni en ausencia de agonista ni en oocitos inyectados con las subunidades mutantes, y que fueron detectados como ráfagas (*clusters*) de aperturas. Estos canales se detectaron en sólo uno de 76 sellos. A un potencial de pipeta de +120 mV, la amplitud media de estos canales fue de 18.4 pA, lo que permitió distinguirlos de los canales endógenos. El histograma de tiempos de estado abierto mostró dos componentes: uno principal de 90  $\mu$ s (área relativa 0.77) y otro de 320  $\mu$ s (área relativa 0.24) (Figura 16A).

En 3 de 33 registros obtenidos en oocitos que expresaban la mutante 9', se detectaron canales activados por ACh 1  $\mu$ M, con una amplitud media de  $13.8 \pm 2.1$  pA (n=3), similares a los obtenidos para el receptor salvaje (Figura 16A). Los histogramas de tiempos de estado abierto evidenciaron dos componentes, ambas de mayor

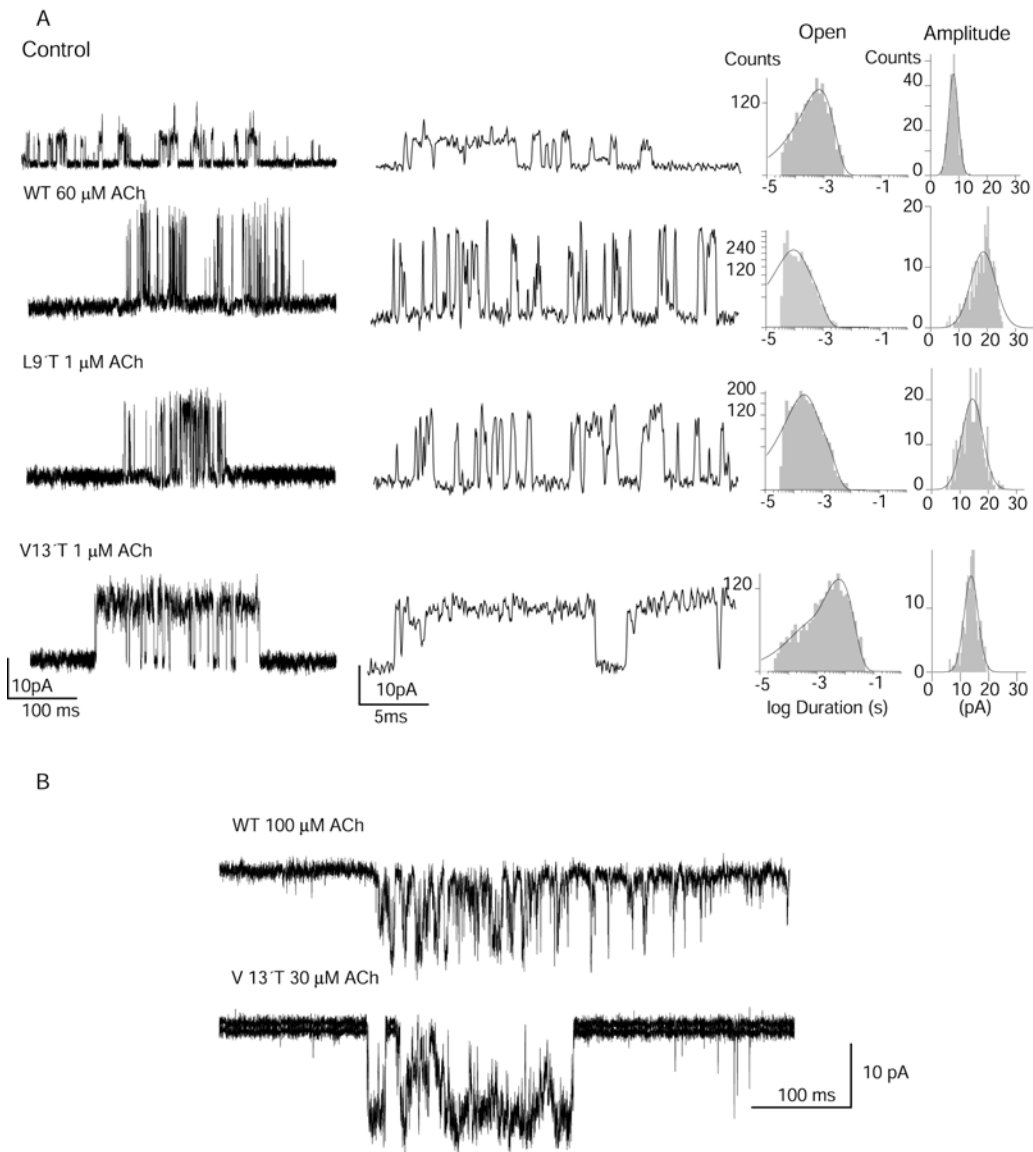
duración que las determinadas para el nAChR  $\alpha 9\alpha 10$ :  $165 \pm 30 \mu s$  (área relativa  $0.63 \pm 0.07$ ) y  $1.1 \pm 0.4 ms$  (área relativa  $0.37 \pm 0.07$ ). La actividad registrada también apareció en *clusters*.

En 3 de 29 sellos obtenidos en oocitos inyectados con las subunidades mutantes 13', se observaron canales activados por ACh  $1\mu M$  cuya amplitud media fue de  $13.5 \pm 2.1 pA$  ( $n=3$ ), similares a los obtenidos para el receptor salvaje (Figura 16A). La actividad registrada apareció en *clusters* muy compactos que presentaban aperturas muy prolongadas, en relación con las observadas para los receptores salvaje y mutante 9', y cierres muy breves. En 2 de los 3 sellos, los histogramas de tiempo de estado abierto fueron similares y se ajustaron a dos componentes. Los promedios de la duración del estado abierto y áreas relativas fueron:  $390 \pm 160 \mu s$  (área relativa  $0.38 \pm 0.30$ ) y  $5.5 \pm 0.5 ms$  (área relativa  $0.63 \pm 0.30$ ). En el tercer registro, además de los dos componentes observados en los otros registros,  $205 \mu s$  (área relativa 0.4) y  $3.7 ms$  (área relativa 0.3), se detectó un tercer componente con una duración aún más prolongada:  $57.7 ms$  (área relativa 0.3).

Con el fin de confirmar que los canales observados correspondían a los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$ , se realizaron registros de canal único en la configuración *outside-out*, antes y después de la aplicación de ACh durante 30 segundos. Se detectaron canales en sólo dos sellos. Uno de ellos se obtuvo de oocitos que expresaban el receptor salvaje, y el otro en oocitos que expresaban el receptor mutante 13'. Los registros obtenidos en esta configuración fueron iguales a los obtenidos en *cell-attached* (Figura 16B). Los canales de la mutante 13' presentaron aperturas de mayor duración que los obtenidos para el receptor salvaje. Ninguno de los dos tipos de canales fue observado antes de la aplicación de ACh o en oocitos no inyectados, apoyando el hecho de que los canales detectados en los registros hechos en la configuración *cell-attached* corresponden a los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$ .

Dado que la probabilidad de encontrar a los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  fue muy baja, no se pudo realizar una caracterización exhaustiva de estos canales, de manera de determinar inequívocamente sus propiedades cinéticas. Sin embargo, existen evidencias fuertes que han permitido sugerir que dichos canales corresponden a los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$ : i- los canales nunca fueron detectados en oocitos no inyectados, ii- los canales correspondientes a los receptores salvaje y mutantes 9' y 13' presentaron cinéticas diferentes, y esas diferencias fueron las esperadas teniendo en cuenta las

observaciones de corrientes macroscópicas, iii- en los dos registros realizados en la configuración de *outside-out*, los canales fueron detectados sólo después de la aplicación de ACh y presentaron amplitudes y cinéticas iguales a las obtenidas en *cell-attached*.



**Figura 16 A**, (izquierda) Registros representativos obtenidos en configuración *cell attached*, en oocitos que expresan los receptores salvaje (WT), mutante 9' y 13'. Como control, se registraron los canales endógenos presentes en oocitos no inyectados. Los registros se muestran a dos escalas temporales, para cada tipo de receptor. La amplitud de banda fue de 5 kHz, donde las aperturas se ven como deflexiones hacia arriba. El potencial de pipeta fue de 120 mV. (derecha) Se muestran los histogramas de tiempo de estado abierto y amplitud, para cada registro. **B**, Registros representativos obtenidos en la configuración *outside-out* luego de la aplicación de ACh, en oocitos que expresan los receptores salvaje (WT) y mutante 13'. La amplitud de banda fue de 5 kHz, donde las aperturas se ven como deflexiones hacia abajo. El potencial de pipeta fue de -70 mV.

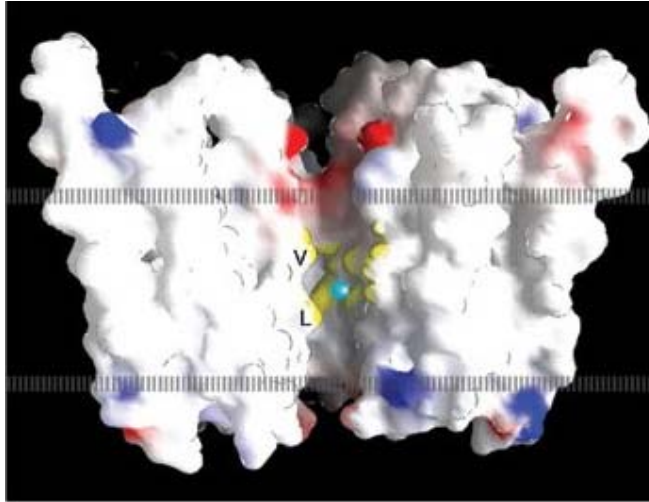


## DISCUSIÓN

### **Los anillos de residuos hidrofóbicos ubicados en la zona central del dominio TM2 están involucrados en el *gating* y posiblemente en la formación de la compuerta del receptor nicotínico $\alpha 9\alpha 10$**

Se ha propuesto que los cuatro dominios transmembranales de los nAChRs estarían involucrados en el *gating* (Karlin, 2002). Sin embargo, existen fuertes evidencias que indican que son los residuos del dominio TM2 los que forman las paredes del poro, la compuerta y el filtro de selectividad de carga del canal.

Si bien este estudio no nos permite determinar la posición exacta de la compuerta del canal, teniendo en cuenta el modelo atómico descrito para el órgano eléctrico de *Torpedo* (Miyazawa et al., 2003, Figura 17), el cual propone la existencia de un cinturón hidrofóbico constrictor del poro constituido por las posiciones 9' y 13', y las evidencias arrojadas por estudios computacionales, que apoyan la hipótesis de una compuerta de naturaleza hidrofóbica que se extiende desde la posición 9' a la 17' y que presenta en la posición 13' su punto máximo de efecto como barrera energética al paso de los iones, podríamos proponer que las interacciones de las cadenas laterales de los residuos 13' son las que juegan un papel clave en la creación de una compuerta de naturaleza hidrofóbica. Esta conclusión se basa en el hecho de que los cambios fenotípicos observados fueron más drásticos para la mutante 13'. Posiblemente la perturbación de las interacciones hidrofóbicas, por la introducción de un residuo polar, podría disminuir la efectividad de la barrera al permitir la sustitución de las moléculas de agua del escudo de hidratación de los iones permeantes por los grupos hidroxilo de la treonina. Así, el ión podría desolvatarse y atravesar la zona de máxima constricción del poro sin requerimientos elevados de energía libre.



**Figura 17** Superficie molecular del poro, obtenido con el programa GRASP. Los colores rojo y azul indican áreas de alta densidad de cargas negativas y positivas, respectivamente; el amarillo señala la zona hidrofóbica que contiene la compuerta; V y L identifican a la  $\alpha$ -Val 13' y  $\alpha$ -Leu 9' del nAChR de *Torpedo*.

Por otro lado, el efecto de la mutación de los residuos 9' y 13' a treonina sobre el *gating* podría deberse a un debilitamiento de los contactos que mantienen cerrado el canal o a un fortalecimiento de las interacciones que lo mantienen abierto.

Si las interacciones hidrofóbicas entre los residuos ubicados en la zona central del TM2 fueran importantes para mantener al poro en el estado cerrado, entonces el debilitamiento de esas interacciones, al introducir un residuo polar, podría reducir el umbral de energía para provocar la apertura del canal y favorecer la isomerización cerrado-abierto (Miyazawa et al., 2003). De esta manera, la sustitución en la posición 13', y en menor grado en la 9', provocó la apertura espontánea de los canales y aumentó la sensibilidad a ACh. Por otro lado, dado que al nivel de canal único se observó un aumento del tiempo medio aparente del estado abierto es posible que el efecto de estas sustituciones también sea el de estabilizar el estado abierto de los canales al desfavorecer la isomerización abierto-cerrado. Este hecho a su vez podría contribuir también a la disminución en los valores de  $CE_{50}$  y a la disminución de la tasa de desensibilización. La estabilización del estado abierto podría deberse a que dichos residuos se mueven a un entorno polar tras la apertura del canal, y el tiempo de residencia en dicho entorno, y por ende el tiempo medio aparente del estado abierto, depende de la polaridad del residuo. La substitución de los residuos 9' y 13' por uno más polar como la treonina estabilizaría este tipo de interacción, produciendo tiempos medios aparentes de estado abierto más prolongados. Además, estudios de rastreo por accesibilidad de cisteínas (SCAM) realizados sobre el nACh muscular sugieren que los residuos 9' y 13' se encontrarían en entornos no polares durante el estado cerrado

y más polares durante el estado abierto (Wilson y Karlin, 2001).

Estos hallazgos son consistentes con nuestra hipótesis de que los residuos hidrofóbicos ubicados en la zona central del dominio TM2 forman parte de la compuerta del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  (Labarca et al., 1995; Miyazawa et al., 2003), y que juegan un papel clave en el *gating* del canal.

Las respuestas producidas por la ACh en el receptor salvaje  $\alpha 9\alpha 10$  son altamente dependientes de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, siendo las respuestas a  $\text{Ca}^{2+}$  0 nominal sólo el 5% de la máxima obtenida a  $\text{Ca}^{2+}$  0.5 nM (Weisstaub et al., 2002). Se ha sugerido que el  $\text{Ca}^{2+}$  se uniría a un sitio extracelular para modificar alostéricamente el acople entre la unión del agonista y el *gating* del canal (Hamill et al., 1981; Weisstaub et al., 2002). Teniendo en cuenta esto, sería esperable que una mutación que favorezca el *gating* del canal por ACh, provoque que la apertura de los receptores mutantes se vuelva independiente de la presencia de cationes divalentes extracelulares. Este razonamiento es consistente con los datos experimentales obtenidos para las mutantes 9' y 13'.

Una mutación que incrementa la habilidad de un receptor de cambiar su conformación de cerrado a abierto, es decir que favorece el *gating*, incrementa la eficacia de los agonistas parciales (Colquhoun, 1998). Esto es consistente con la observación de que en los receptores mutantes el agonista parcial colina resultó ser un agonista total. Por otro lado, los agonistas parciales de muy baja eficacia podrían comportarse como antagonistas del receptor salvaje ya que al tener una habilidad muy limitada para inducir un cambio conformacional al unirse al receptor, inducirían aperturas con una probabilidad muy baja y no generarían corrientes macroscópicas detectables (Rayes et al., 2004). En el caso de un receptor mutante con un *gating* favorecido, estos tipos de agonistas podrían producir corrientes macroscópicas medibles. Este razonamiento podría explicar la observación de que antagonistas del receptor salvaje, como la estricnina, la nicotina y la muscarina, se comportaron como agonistas parciales de los receptores mutantes.

Dado que los nAChRs son proteínas alostéricas, es razonable pensar que una mutación en el poro del canal podría afectar tanto el *gating* como la unión del agonista a su sitio específico (Colquhoun, 1998). Así, los cambios conformacionales podrían propagarse al dominio N-terminal extracelular y conducir a modificaciones en la afinidad aparente por la ACh, a la conversión de antagonistas en agonistas y a la

pérdida de la potenciación por  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, el hecho de que los registros de canal único revelen un incremento en los tiempos medios aparentes de estado abierto de los receptores mutantes y que exista una correlación inversa entre las  $\text{CE}_{50}$  a ACh y el grado de actividad espontánea de los canales, apoyaría la hipótesis de que el mecanismo por el cual las mutaciones en los residuos 9' y 13' del TM2 provocan los cambios fenotípicos antes descritos, es el de afectar el *gating*, favoreciendo la apertura del canal.

### **Los registros de canal único de receptores $\alpha 9\alpha 10$ salvaje y mutantes**

Los registros de canal único que se presentan en este trabajo, no sólo proveen evidencias que apoyan el mecanismo propuesto para explicar los fenotipos observados, sino que son los primeros en reportarse para el nAChR  $\alpha 9\alpha 10$ . Si bien el número de sellos que resultaron positivos fue extremadamente pequeño, los canales detectados pudieron ser diferenciados de los endógenos del oocito, gracias a su mayor amplitud, que a su vez fue incrementada con el uso de soluciones sin  $\text{Mg}^{2+}$  y con bajo  $\text{Ca}^{2+}$  (Weisstaub et al., 2002).

La baja tasa de éxito en encontrar a los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  en oocitos, podría deberse a un bajo nivel de expresión de estos receptores en la superficie de la membrana. En el caso del receptor salvaje, la amplitud de las corrientes macroscópicas máximas fue de 600 nA, 10 veces menores que las reportadas para el nAChR muscular (Labarca et al., 1995) donde se han podido realizar registros de canal único con un alto rendimiento. Si consideramos una distribución homogénea de los receptores en la superficie de los oocitos, una amplitud promedio de las corrientes unitarias de 10 pA, una amplitud de corriente macroscópica de 600 nA y una probabilidad de apertura de 0.5, el número de receptores por  $\mu\text{m}^2$  sería de 0.04! Por otro lado, una mayor densidad de canales pero con una menor probabilidad de apertura podría explicar también la baja tasa de éxito en los registros de canal único.

### Comparación con otros miembros de la familia de receptores con asa de cisteínas

Diversos estudios de mutagénesis han sido realizados con otros receptores de la familia de asa de cisteínas. En los nAChRs muscular y  $\alpha 7$ , la mutación de la Leu 9' provoca cambios en la  $CE_{50}$  a ACh (Filatov y White, 1995; Labarca et al., 1995; Revah et al., 1991), aumenta la actividad espontánea de los canales (Bertrand et al., 1997) y permite la activación por los antagonistas clásicos (Bertrand et al., 1993a; Palma et al., 1999; Palma et al., 1996). Resultados similares se han obtenido al mutar el mismo residuo en los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> (Chang y Weiss, 1999, 1998). Más aún, se han obtenido fenotipos similares al mutar la Val 13' del nAChR  $\alpha 7$  a treonina (Bertrand et al., 1997; Corringer et al., 1999). Todos estos trabajos han relacionado la zona central del dominio TM2 con el *gating* del nAChR.

En este trabajo se presentan resultados obtenidos de un estudio sistemático que resulta de la mutagénesis de tres anillos hidrofóbicos del dominio TM2 del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$ . La comparación de las magnitudes de los fenotipos resultantes indica que las interacciones al nivel de la posición 13', y en menor grado la 9', serían las responsables de crear una barrera energética al paso de los iones. Si bien estos resultados podrían considerarse tan sólo confirmatorios de los reportados anteriormente, hay que destacar que se han observado diferencias importantes entre los efectos de las mutaciones en  $\alpha 9\alpha 10$  en comparación a los observados en otros nAChRs. En el nAChR  $\alpha 7$ , la magnitud de los fenotipos, por ejemplo el cambio en la  $CE_{50}$  para la ACh y la activación por antagonistas, es mayor en la mutante 9' que en la 13' (Galzi et al., 1996b). Además, en el nAChR  $\alpha 7$  aparece una conductancia adicional a bajas concentraciones de ACh en las mutantes 9' y 13' (Galzi et al., 1992; Revah et al., 1991). Este resultado se ha interpretado como la conversión del estado desensibilizado no conductor del receptor salvaje en un estado conductor en los mutantes. El hecho de que no se hayan detectado estados conductores adicionales en las mutantes 9' y 13' del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  indica que, a diferencia de lo propuesto para el receptor  $\alpha 7$ , no se necesita invocar un estado desensibilizado conductor para explicar los resultados obtenidos. Sin embargo, no se puede descartar el hecho de que un estado conductor adicional pueda existir y que no se haya podido detectar, ya sea por una baja tasa de éxito en encontrarlos o porque dicho estado sea de muy baja conductancia y no pueda distinguirse de los canales endógenos del oocito.

Las sustituciones hidrofílicas en la posición 9' del nAChR muscular son independientes, equivalentes y multiplicativas en sus efectos sobre la  $CE_{50}$  para la ACh (Filatov y White, 1995; Labarca et al., 1995). Por el contrario, los valores de  $CE_{50}$  de las mutantes simples y dobles en las posiciones 9' y 13' del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  indican que en esas posiciones ambas subunidades contribuyen en una manera asimétrica y no aditiva (Tabla 2). Esto puede inferirse del hecho de que ambas mutantes simples presentan la misma disminución en sus  $CE_{50}$  respecto del receptor salvaje, a pesar de que no pueden estar en una misma proporción en un ensamblado pentamérico del nAChR. En consecuencia, las  $CE_{50}$  de las mutantes dobles ( $\alpha 9^*\alpha 10^*$ ) son diferentes de las calculadas por la multiplicación de los cambios en las  $CE_{50}$  de las mutantes simples. Por ejemplo, en la mutación 9', la  $CE_{50}$  decrece 2.7 y 2.6 veces en receptores que contienen la subunidad  $\alpha 9$  o  $\alpha 10$  mutada, respectivamente. La disminución de la  $CE_{50}$  calculada si ambos tipos de subunidad contribuyeran independientemente sería de 7 veces. Sin embargo, los resultados experimentales muestran una disminución de 31 veces en la  $CE_{50}$  del receptor con sus cinco subunidades mutadas. Este resultado podría estar revelando una asimetría funcional entre las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  tanto en el papel que estas leucinas juegan durante el *gating* o en el grado de perturbación que generan por su mutación a treonina.

Siguiendo el modelo atómico de 4Å de resolución del poro (Miyazawa et al., 2003), la zona de mayor constricción del poro involucra a las posiciones 9' y 13' del TM2, permitiendo interacciones entre las cadenas laterales de residuos de subunidades vecinas (Figura 7). Este hecho puede explicar el sinergismo potenciador de los efectos de las mutaciones en esas posiciones. Dado que a través de los residuos 9' y 13' se establecen contactos entre subunidades vecinas, la mutación de éstos no sólo afectaría la estabilidad de la subunidad a la cual pertenece sino también de la subunidad vecina que contacta. De esa forma, el efecto de la mutación se propagaría a subunidades vecinas provocando un efecto potenciado.

Resultados diferentes se obtuvieron con la posición 17', donde las mutaciones en  $\alpha 9$  o  $\alpha 10$  produjeron disminuciones de la  $CE_{50}$  para la ACh de 2.6 y 5.1 veces, respectivamente. El cambio esperado en la  $CE_{50}$  para la mutante doble en el caso de que ambas subunidades contribuyeran independientemente a la sensibilidad a ACh sería de 13.3 veces, lo cual coincide con lo encontrado experimentalmente (13.4 veces, Tabla 2). Por ello, se puede postular que en esta posición ambas subunidades

contribuyen independiente y simétricamente a la sensibilidad a ACh, resultado que se puede explicar si se considera que según el modelo atómico de 4Å los residuos 17' no están localizados en la zona de mayor constricción del poro y por ende pueden interactuar solamente con residuos de su misma subunidad. Esto explicaría el hecho de que las mutaciones en 17' sean multiplicativas en sus efectos sobre la CE<sub>50</sub>, ya que el disturbio provocado por la mutación únicamente afectaría la estabilidad de la subunidad que porta dicha mutación y no a sus vecinas.

Esto difiere de lo descrito para el residuo 16' del nAChR muscular, donde las contribuciones de las distintas subunidades al *gating* son asimétricas (Labarca et al., 1995).

## **PARTE II**

### **DETERMINACIÓN DE LA ESTEQUIOMETRÍA DEL nAChR RECOMBINANTE $\alpha 9\alpha 10$**



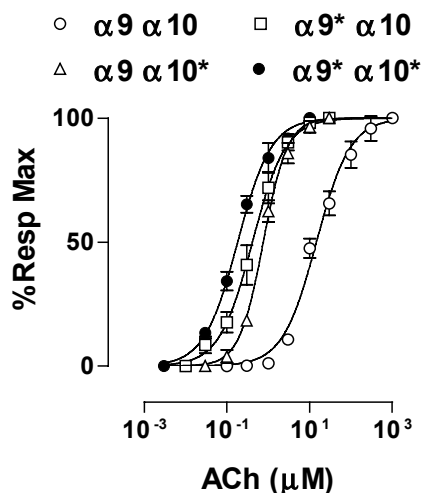
## INTRODUCCIÓN

El nAChR muscular es el mejor caracterizado dentro de los canales iónicos activados por ligando. Se conoce su composición de subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  en ratón adulto) y la estequiometría de las mismas (dos copias de  $\alpha$  y una de  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ ). A pesar de la homología entre las subunidades musculares y neuronales, y la similitud en las estructuras pentaméricas de los complejos del receptor muscular y neuronales, la estequiometría y composición de los nAChRs neuronales son aún interrogantes. Esto se debe al alto número de diferentes tipos de subunidades neuronales de nAChRs existentes (doce tipos de subunidades clonadas,  $\alpha 2$  a  $\alpha 10$  y  $\beta 2$  a  $\beta 4$ ), y también a que el número de combinaciones posibles es muy alto (McGehee y Role, 1995). Estudios de expresión en sistemas heterólogos, han permitido simplificar estas posibilidades. Algunas subunidades  $\alpha$  ( $\alpha 7$ -  $\alpha 9$ ) pueden formar receptores homoméricos, mientras que la mayoría de ellas ( $\alpha 2$ -  $\alpha 4$  y  $\alpha 6$ ) pueden formar receptores funcionales sólo si se coexpresan con una subunidad  $\beta$  ( $\beta 2$  o  $\beta 4$ ). Estudios de radiomarcación y de electrofisiología al nivel de canal único en el nAChR  $\alpha 4\beta 2$  de pollo expresado en oocitos de *Xenopus laevis* sugieren que este receptor es un pentámero con una estequiometría  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$  (Anand et al., 1991; Cooper et al., 1991). Por otro lado, se ha demostrado que ese mismo receptor tiene múltiples estequiometrías alternativas, y que la proporción de expresión de cada una de ellas depende de las condiciones experimentales (Nelson et al., 2003) o de la disponibilidad relativa de las subunidades que componen el receptor (Zwart y Vijverberg, 1998).

La expresión de los ARNc de las subunidades nicotínicas  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  en oocitos de *Xenopus laevis* ha evidenciado la formación de receptores funcionales  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$ , pero no de receptores homoméricos  $\alpha 10$ . Una de las peculiaridades del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  es que está constituido únicamente por dos tipos de subunidades  $\alpha$ . Mucho se ha avanzado en el conocimiento de la farmacología y biofísica de este receptor como así también en el papel que cumple en la fisiología del sistema auditivo, sin embargo la estequiometría de las subunidades que lo componen es un dato que aún se desconoce.

Para establecer la estequiometría del receptor recombinante  $\alpha 9\alpha 10$  se usó una modificación de la estrategia empleada por Chang y colaboradores para determinar la estequiometría del receptor recombinante GABA<sub>A</sub> (Chang et al., 1996). Dicha

estrategia se basa en la utilización de una mutación marcadora de la incorporación de subunidades al receptor. En el presente estudio, se utilizó la mutación de la valina 13' del dominio TM2 a treonina. En la Parte I se ha demostrado que la mutación V13'T provoca, entre otros cambios fenotípicos, un corrimiento en la  $CE_{50}$  hacia concentraciones más bajas de ACh, y que dicho incremento en la sensibilidad a ACh depende de la cantidad y tipo de subunidad mutada incorporada al receptor (Figura 18 y Tabla 2).



**Figura 18** Curvas de concentración respuesta a ACh. Las respuestas fueron normalizadas y referidas a las respuestas máximas a ACh a un  $V_{sostén}$  de  $-70$  mV, en cada caso. Se muestra la media y el error estándar de 4 - 5 experimentos por grupo. La línea continua corresponde al ajuste a la ecuación de Hill. Los valores de  $CE_{50}$  para cada ajuste fueron (media  $\pm$  SEM):  $\alpha 9\alpha 10$ ,  $14.6 \pm 5.3$   $\mu M$ ;  $\alpha 9^*\alpha 10$ ,  $0.42 \pm 0.02$   $\mu M$ ;  $\alpha 9\alpha 10^*$ ,  $0.46 \pm 0.02$   $\mu M$ ;  $\alpha 9^*\alpha 10^*$ ,  $0.17 \pm 0.01$   $\mu M$ . \*: V13'T

En este estudio se intentará inferir la estequiometría del receptor recombinante  $\alpha 9\alpha 10$  a partir del cambio en la sensibilidad a ACh inducida por la incorporación de estas mutaciones. Los datos presentados en la Figura 18 y Tabla 2 muestran que las mutaciones  $\alpha 9V13'T$  ( $\alpha 9^*$ ) y  $\alpha 10V13'T$  ( $\alpha 10^*$ ) producen cambios en la  $CE_{50}$  para la ACh de la misma magnitud ( $\sim 35$  y  $32$  veces, respectivamente). Suponiendo que el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  es un pentámero, entonces los efectos de las mutaciones parecerían no ser equivalentes para ambas subunidades, dado que debería ser mayor el efecto al mutar aquella subunidad que sea más abundante en el pentámero. Debido a ello, no se podrá deducir la estequiometría basándose en las diferencias en la magnitud de los cambios de  $CE_{50}$  inducidos por las distintas mutaciones. Por lo tanto, para determinar la estequiometría del receptor recombinante  $\alpha 9\alpha 10$  se usará una estrategia alternativa que se basa en la coexpresión de subunidades salvajes y mutantes de cada clase (por ej.  $\alpha 9$  y  $\alpha 9^*$ ) con su contraparte salvaje (por ej.  $\alpha 10$ ), de manera que resulte en poblaciones mixtas de receptores con distintas sensibilidades para ACh. Behe y

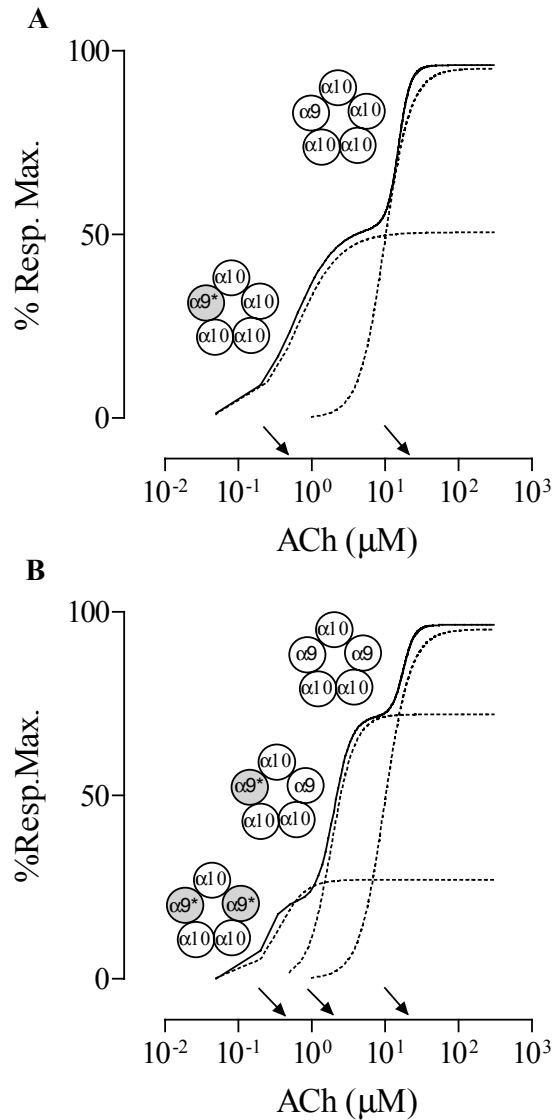
colaboradores usaron una estrategia similar de coexpresión de subunidades mutantes y salvajes para determinar el número de subunidades NR1 incorporadas al receptor recombinante NMDA, aunque en ese caso los cambios inducidos por la mutación fueron al nivel de la conductancia de canal único (Behe et al., 1995).

Teniendo en cuenta lo anteriormente dicho se pueden hacer las siguientes predicciones:

♣ Si en el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  hay una única subunidad  $\alpha 9$ , la coexpresión de  $\alpha 9$  y  $\alpha 9^*$  con  $\alpha 10$  dará por resultado una CCR con dos componentes (Figura 19A): un componente resultante de la activación de nAChRs  $\alpha 9V13'T\alpha 10$  y el otro componente de la activación de receptores  $\alpha 9\alpha 10$ . Además, según la Figura 14.y la Tabla 2 las  $CE_{50}$  de esos componentes serían  $\sim 0.42$  y  $14.62 \mu M$ , respectivamente.

♣ Si el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  contiene dos subunidades  $\alpha 9$ , la CCR resultante de la coexpresión de  $\alpha 9$ ,  $\alpha 9^*$  y  $\alpha 10$  tendría tres componentes (Figura 19B): un componente de receptores con sus dos  $\alpha 9$  salvajes ( $CE_{50} \sim 14.62 \mu M$ ), un componente de receptores con sus dos  $\alpha 9$  mutantes ( $CE_{50} \sim 0.42 \mu M$ ), y un componente con una sensibilidad a ACh intermedia correspondiente a receptores con una subunidad  $\alpha 9$  salvaje y la otra subunidad  $\alpha 9$  mutada. Si las mutaciones de ambas subunidades  $\alpha 9$  fueran equivalentes, el corrimiento en la  $CE_{50}$  debido a cada subunidad sería la raíz cuadrada del cambio observado con ambas subunidades mutadas ( $\sim 35$  veces, Tabla 2). Así, cada subunidad  $\alpha 9^*$  contribuiría en 5.9 veces al incremento en la sensibilidad a ACh, prediciendo un componente intermedio con una  $CE_{50}$  de  $2.48 \mu M$ .

De igual forma se podría inferir el número de componentes y sus  $CE_{50}$  que resultarían de un receptor que contenga tres o cuatro subunidades  $\alpha 9$ . En forma complementaria, se podría inferir el número de subunidades  $\alpha 10$  presentes en el receptor recombinante  $\alpha 9\alpha 10$ , a través del número de componentes de la CCR para ACh realizadas tras la coinyección de mezclas de ARNc de  $\alpha 10$  salvaje y mutado con  $\alpha 9$  salvaje.



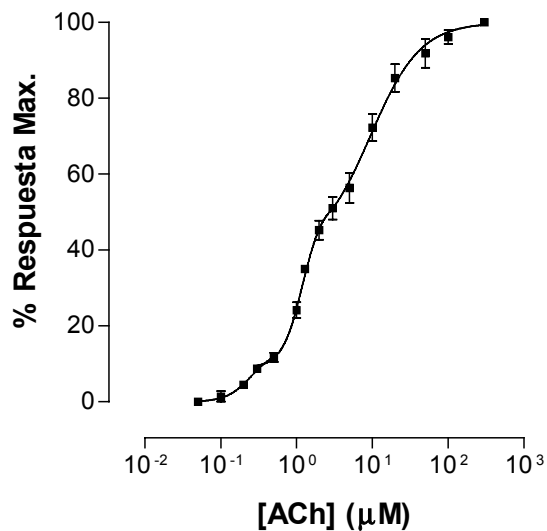
**Figura 19 A, Resultados esperados si el nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  contiene una única subunidad  $\alpha 9$ .** La CCR a ACh resultante de la coexpresión de  $\alpha 9$ ,  $\alpha 9^*$  y  $\alpha 10$  presenta dos componentes (línea continua): una correspondiente a receptores  $\alpha 9\alpha 10$  y la otra correspondiente a receptores  $\alpha 9^*\alpha 10$ . (líneas punteadas). **B, Resultados esperados si el nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  contiene dos subunidades  $\alpha 9$ .** La CCR a ACh resultante de la coexpresión de  $\alpha 9$ ,  $\alpha 9^*$  y  $\alpha 10$  presenta tres componentes (línea continua): una correspondiente a receptores  $\alpha 9\alpha 10$ , una correspondiente a receptores  $\alpha 9^*\alpha 10$  y una intermedia correspondiente a receptores que contienen una subunidad  $\alpha 9^*$  y una subunidad  $\alpha 9$  (líneas punteadas). \*: V13T

Las flechas indican los valores de  $CE_{50}$  para las distintas componentes.

## RESULTADOS

### Coexpresión de las subunidades $\alpha 9$ , $\alpha 9V13T$ y $\alpha 10$

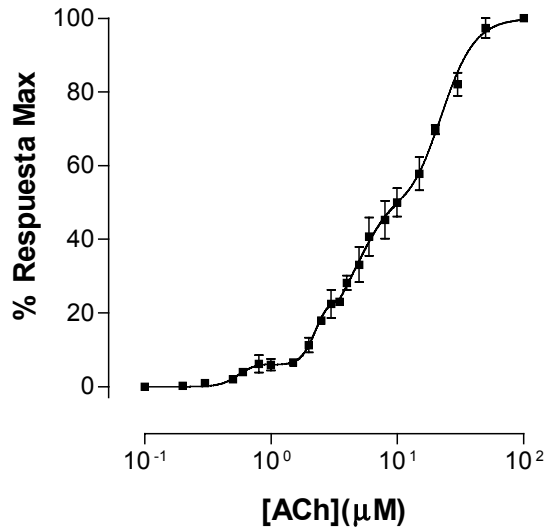
La Figura 20 muestra los resultados obtenidos tras la coinyección de las subunidades  $\alpha 9$ ,  $\alpha 9^*$  y  $\alpha 10$  en un mismo oocito, con una relación de ARNc inyectado de 1:1:2, respectivamente. La CCR resultante fue mejor descrita por la suma de tres ecuaciones de Hill. La Tabla 4 presenta los valores de  $CE_{50}$  y porcentaje de respuesta máxima correspondiente a cada componente de la CCR. La  $CE_{50}$  del primer componente,  $0.23 \pm 0.08 \mu M$ , correspondería a receptores  $\alpha 9^* \alpha 10$  ( $CE_{50} = 0.42 \pm 0.02 \mu M$ , Tabla.2), y la del tercer componente,  $9.29 \pm 1.51 \mu M$ , a receptores  $\alpha 9 \alpha 10$  salvajes ( $CE_{50} = 14.62 \pm 1.32 \mu M$  Tabla.2). La presencia de un componente intermedio ( $CE_{50} = 1.11 \pm 0.08 \mu M$ ) indicaría que el nAChR  $\alpha 9 \alpha 10$  contiene más de una subunidad  $\alpha 9$  (Figura 19B). La  $CE_{50}$  del componente intermedio concuerda con la predicha para un receptor  $\alpha 9 \alpha 10$  que contendría dos subunidades  $\alpha 9$  ( $CE_{50} = 2.48 \mu M$ ). Nuestra interpretación de este componente intermedio es que representa la activación de receptores que contienen una subunidad  $\alpha 9$  salvaje y una subunidad  $\alpha 9$  mutada.



**Figura 20** Curva de concentración respuesta a ACh en oocitos inyectados con las subunidades  $\alpha 9$ ,  $\alpha 9^*$  y  $\alpha 10$  en una relación 1:1:2. Las respuestas fueron normalizadas y referidas a las respuestas máximas a ACh a un  $V_m$  de  $-70mV$ , en cada caso. Se muestra la media y el error estándar de 6 experimentos. La CCR a ACh fue mejor descrita con la suma de tres ecuaciones de Hill (línea continua), sugiriendo, en términos de sensibilidad a ACh, que existen tres poblaciones de receptores. Los valores de  $CE_{50}$  y % Resp. Max. de cada componente se muestran en la Tabla 4. La existencia de tres componentes sugiere que existen dos subunidades  $\alpha 9$  en el nAChR  $\alpha 9 \alpha 10$ .

### Coexpresión de las subunidades $\alpha 9$ , $\alpha 10$ y $\alpha 10V13^T$

La Figura 21 muestra los resultados obtenidos tras la coinyección de las subunidades  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$  y  $\alpha 10^*$  en un mismo oocito, con una relación de ARNc inyectado de 2:1:1. La CCR resultante fue mejor descrita por la suma de cuatro ecuaciones de Hill. La Tabla 5 presenta los valores de  $CE_{50}$  y % de respuesta máxima correspondiente a cada componente de la CCR. La  $CE_{50}$  del primer componente,  $0.55 \pm 0.08 \mu M$ , correspondería a receptores  $\alpha 9\alpha 10^*$  ( $CE_{50} = 0.46 \pm 0.02 \mu M$ , Tabla 2), y la del cuarto componente,  $CE_{50} = 22.70 \pm 1.33 \mu M$ , a receptores  $\alpha 9\alpha 10$  salvajes ( $CE_{50} = 14.62 \pm 1.32 \mu M$ , Tabla 2). La presencia de dos componentes intermedios ( $CE_{50} = 2.22 \pm 0.21 \mu M$  y  $CE_{50} = 5.00 \pm 0.41 \mu M$ ) indicaría que el nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  contiene tres subunidades  $\alpha 10$ . Asumiendo que las tres subunidades  $\alpha 10$  aportan de manera equivalente al cambio en el valor de  $CE_{50}$  observado para el receptor  $\alpha 9\alpha 10V13^T$  ( $\sim 32$  veces, Tabla 2), cada subunidad  $\alpha 10$  contribuiría a un incremento en  $\sim 3.13$  veces en la sensibilidad a ACh, prediciendo dos componentes intermedios: uno con una  $CE_{50}$  de  $4.67 \mu M$  para receptores con dos  $\alpha 10$  salvajes y una  $\alpha 10$  mutada, y otro con una  $CE_{50}$  de  $1.49 \mu M$  para receptores con una  $\alpha 10$  salvaje y dos  $\alpha 10$  mutadas. La  $CE_{50}$  del segundo componente ( $CE_{50} = 2.22 \pm 0.21 \mu M$ ) concuerda con el predicho para un receptor  $\alpha 9\alpha 10$  que contendría dos subunidades  $\alpha 10$  salvajes y una mutada, y la  $CE_{50}$  del tercer componente ( $CE_{50} = 5.00 \pm 0.41 \mu M$ ) concuerda con el predicho para un receptor  $\alpha 9\alpha 10$  que contendría dos subunidades  $\alpha 10$  mutadas y una salvaje.



**Figura 21** Curva de concentración respuesta a ACh en oocitos inyectados con las subunidades  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$  y  $\alpha 10^*$  en una relación 2:1:1. Las respuestas fueron normalizadas y referidas a las respuestas máximas a ACh a un  $V_{\text{sostén}}$  de  $-70\text{mV}$ , en cada caso. Se muestra la media y el error estándar de 6 experimentos. La CCR a ACh fue mejor descrita con la suma de cuatro ecuaciones de Hill (línea continua), sugiriendo, en términos de sensibilidad a ACh, que existen cuatro poblaciones de receptores. Los valores de  $CE_{50}$  y % Resp. Max. de cada componente se muestran en la Tabla 5. La existencia de cuatro componentes sugiere que existen tres subunidades  $\alpha 10$  en el nAChR  $\alpha 9\alpha 10$ .

**La estequiometría del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  es  $(\alpha 9)_2 (\alpha 10)_3$**

Los resultados presentados hasta ahora indicarían que el nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  contiene dos subunidades  $\alpha 9$  y tres  $\alpha 10$ . Sin embargo, teniendo en cuenta la posibilidad de que existan múltiples componentes intermedios indistinguibles en las CCR de las Figuras 20 y 21, se repitieron los experimentos de coinyección descritos anteriormente, variando la relación de ARNc salvaje : mutado (por ejemplo  $\alpha 9 : \alpha 9^*$ ) coinyectado con su contraparte salvaje (por ejemplo  $\alpha 10$ ). De esta forma, si el componente intermedio de la Figura 20 consistiera en más de un componente, al variar la relación de ARNc inyectado  $\alpha 9:\alpha 9^*$  deberían variar las fracciones relativas de las distintas combinaciones que constituyan el componente intermedio y cambiar la  $CE_{50}$  aparente de dicho componente. De igual manera se podría aplicar para los cambios en la relación  $\alpha 10:\alpha 10^*$ .

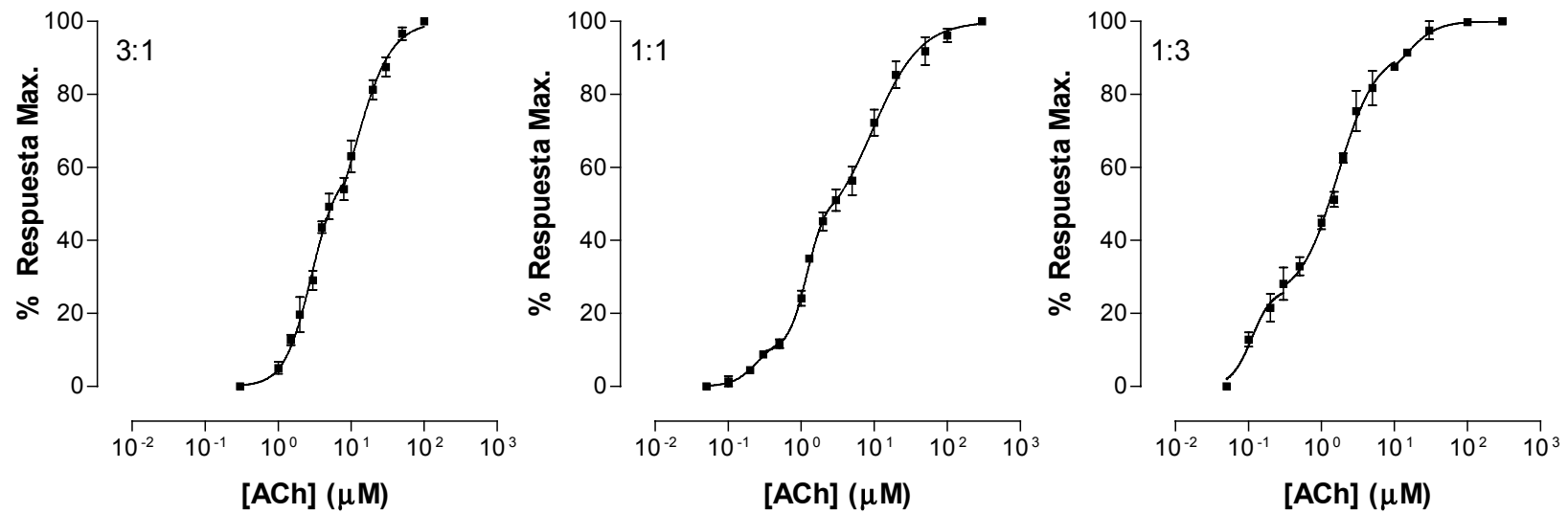
La Figura 22 muestra las CCR para la ACh obtenidas en oocitos inyectados con las subunidades  $\alpha 9$ ,  $\alpha 9^*$  y  $\alpha 10$ , donde la relación de ARNc inyectado  $\alpha 9:\alpha 9^*$  fue 3:1, 1:1 o 1.3, mientras que la relación final  $(\alpha 9 + \alpha 9^*):\alpha 10$  fue 1:1. Se incluyó la CCR de la Figura 20 con el fin de facilitar la comparación de los resultados. De la misma forma, la Figura 23 muestra las CCR para ACh obtenidas en oocitos inyectados

con las subunidades  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$  y  $\alpha 10^*$ , donde la relación de ARNc inyectado  $\alpha 10:\alpha 10^*$  fue 3:1, 1:1 o 1.3, mientras que la relación final  $\alpha 9:(\alpha 10 + \alpha 10^*)$  fue 1:1. Como se observa en las Figuras 22 y 23, a todas las relaciones de ARNc inyectadas, la CCR para la ACh presentó tres componentes para la coexpresión de  $\alpha 9$ ,  $\alpha 9^*$  y  $\alpha 10$ , y cuatro componentes para la coexpresión de  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$  y  $\alpha 10^*$ , a excepción de las correspondientes a las relaciones salvaje:mutado 3:1. En dichos casos la componente correspondiente al receptor que contiene todas las subunidades estudiadas mutadas ( $(\alpha 9^*)_2(\alpha 10)_3$  o  $(\alpha 9)_2(\alpha 10^*)_3$ ) no pudo ser detectada. Esto es consistente con el hecho de que a las relaciones salvaje:mutado 1:1 dichas componentes presentaron bajos porcentajes de respuesta máximo ( $\alpha 9^* \sim 12\%$ ;  $\alpha 10^* \sim 6\%$ ).

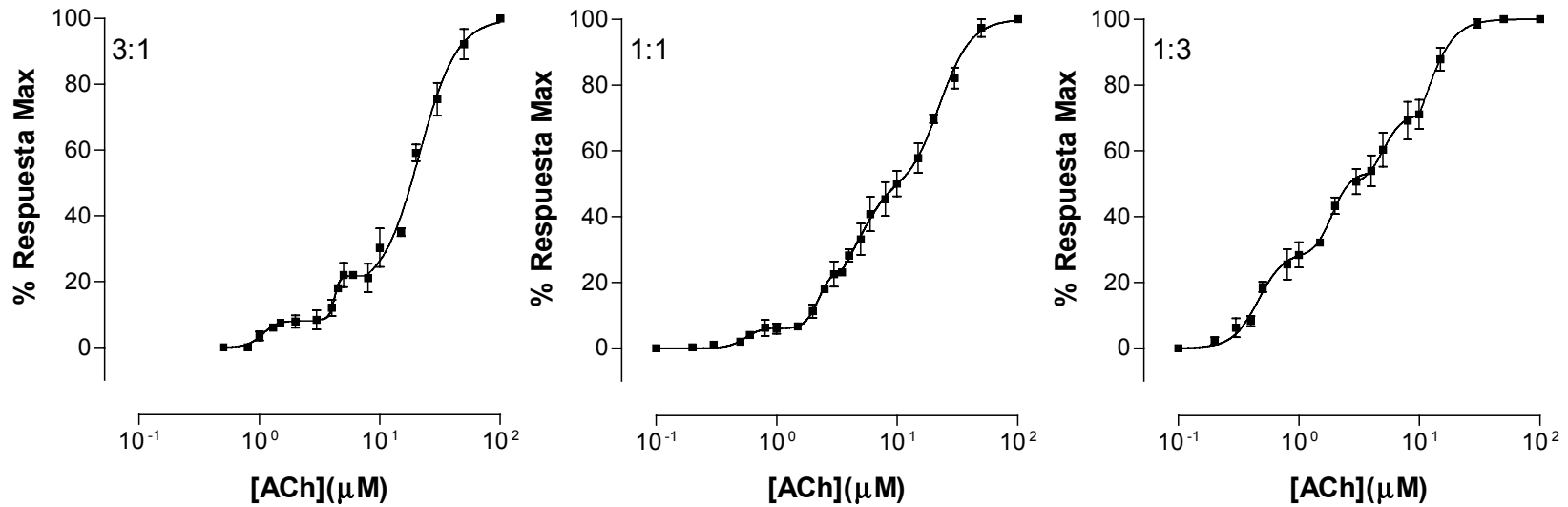
Las Tablas 4 y 5 presentan los valores de las  $CE_{50}$  y los porcentajes de respuesta máxima de cada componente, para las distintas relaciones de ARNc inyectado  $\alpha 9:\alpha 9^*$  y  $\alpha 10:\alpha 10^*$ , respectivamente. Los porcentajes de respuesta de cada componente variaron según lo esperado para cada relación de ARNc inyectado, ya que por ejemplo, las amplitudes de los componentes salvajes aumentaron en la relación salvaje:mutado 3:1 respecto de la relación 1:1. Cambios similares se pueden observar para los distintos componentes en las CCR. Los valores de  $CE_{50}$  de las distintas componentes resultaron independientes de la amplitud de cada componente.

Estas evidencias sugieren que en términos de sensibilidad a ACh existen tres tipos de receptores cuando se coexpresan  $\alpha 9$ ,  $\alpha 9^*$  y  $\alpha 10$ , y cuatro tipos de receptores cuando se coexpresan  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$  y  $\alpha 10^*$ . Esto apoyaría la hipótesis de que el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  es un pentámero compuesto por dos subunidades  $\alpha 9$  y tres  $\alpha 10$ .





**Figura 22** Curvas de concentración respuesta para ACh en ovocitos inyectados con las subunidades  $\alpha 9$ ,  $\alpha 9V13'T$  y  $\alpha 10$ , donde la relación de ARNc inyectado  $\alpha 9:\alpha 9V13'T$  fue 3:1, 1:1 o 1.3. En todos los casos, la relación de ARNc total inyectado  $\alpha 9:\alpha 10$  fue 1:1. Las respuestas fueron normalizadas y referidas a las respuestas máximas a ACh a un  $V_{sostén}$  de  $-70mV$ , en cada caso. Se muestra la media y el error estándar de 6 - 7 experimentos. Las CCR a ACh fueron mejor descritas con la suma de tres ecuaciones de Hill (línea continua). Los valores de  $CE_{50}$  y % Resp. Max. de los distintos componentes de cada CCR se muestran en la Tabla 4.



**Figura 23** Curvas de concentración respuesta para ACh en ovocitos inyectados con las subunidades  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$  y  $\alpha 10V137T$ , donde la relación de ARNc inyectado  $\alpha 10:\alpha 10V137T$  fue 3:1, 1:1 o 1.3. En todos los casos, la relación de ARNc total inyectado  $\alpha 9:\alpha 10$  fue 1:1. Las respuestas fueron normalizadas y referidas a las respuestas máximas a ACh a un  $V_{sostén}$  de  $-70mV$ , en cada caso. Se muestra la media y el error estándar de 5 - 9 experimentos. Las CCR a ACh fueron mejor descritas con la suma de cuatro ecuaciones de Hill (línea continua). Los valores de  $CE_{50}$  y % Resp. Max. de los distintos componentes de cada CCR se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 4 CE<sub>50</sub> y % Resp. Max. de los componentes de las CCR a ACh para las diferentes relaciones de ARNc α9: α9V13'T inyectadas**

α9:α9*	3:1		1:1		1:3	
	CE <sub>50</sub> (μM)	%Resp.Max.	CE <sub>50</sub> (μM)	%Resp.Max.	CE <sub>50</sub> (μM)	%Resp.Max.
1°comp. (α9*) <sub>2</sub> (α10) <sub>3</sub>		ND	0.23±0.08	11.77±4.45	0.14±0.03	32.46±6.17
2°comp. α9α9*(α10) <sub>3</sub>	2.54±0.49	53.18±13.95	1.11±0.08	28.78±6.90	1.81±0.21	54.12±11.48
3°comp. (α9) <sub>2</sub> (α10) <sub>3</sub>	17.76±4.67	47.78±16.06	9.29±1.51	58.06±6.60	17.63±7.93	13.09±7.28
n	6		6		7	

Los valores reportados son la media ± SEM. En todos los casos, la relación de ARNc total inyectado α9:α10 fue 1:1. ND: no detectable, \*: V13'T

**Tabla 5 CE<sub>50</sub> y % Resp. Max. de los componentes de las CCR a ACh para las diferentes relaciones de ARNc α10: α10V13'T inyectadas**

α10:α10*	3:1		1:1		1:3	
	CE <sub>50</sub> (μM)	%Resp.Max.	CE <sub>50</sub> (μM)	%Resp.Max.	CE <sub>50</sub> (μM)	%Resp.Max.
1°comp. (α9) <sub>2</sub> (α10*) <sub>3</sub>		ND	0.55±0.08	6.16±1.51	0.47±0.04	29.96±2.70
2°comp. (α9) <sub>2</sub> (α10*) <sub>2</sub> α10	1.06±0.30	8.35±4.72	2.22±0.21	16.31±5.55	1.86±0.11	20.53±4.13
3°comp. (α9) <sub>2</sub> α10*(α10) <sub>2</sub>	4.20±0.29	12.34±3.98	5.00±0.41	22.35±7.39	4.92±0.35	18.65±5.17
4°comp. (α9) <sub>2</sub> (α10) <sub>3</sub>	22.15±1.28	81.01±5.35	22.70±1.33	57.48±4.84	14.11±0.83	30.45±3.54
n	5		6		9	

Los valores reportados son la media ± SEM. En todos los casos, la relación de ARNc total inyectado α9:α10 fue 1:1. ND: no detectable, \*: V13'T

**La estequiometría del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  no depende de la disponibilidad relativa de las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$**

Por último, se consideró la posibilidad de que la estequiometría del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  varíe con la abundancia relativa de las subunidades que lo componen. Para ello, se inyectaron  $\alpha 9^*:\alpha 10$  en relación 4:1, y  $\alpha 9:\alpha 10^*$  en relación 1:4. Si la mayor disponibilidad de subunidades mutadas puede incrementar el número de subunidades incorporadas al receptor, la  $CE_{50}$  debería ser menor a la obtenida con la inyección de cantidades equivalentes de ARNc (Figura 18, Tabla 2). La Tabla 6 muestra los resultados de estos experimentos. Para ambos casos las  $CE_{50}$  de las CCR para ACh obtenidas al inyectar ARNc mutado:salvaje en relación 4:1, resultaron similares a las obtenidas con la inyección de cantidades equivalentes de ARNc. Estos resultados indicarían que, al menos a estas relaciones de ARNc, el número de subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  que constituyen el nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  es fijo e independiente de la disponibilidad de dichas subunidades.

**Tabla 6**

Relación de ARNc inyectado	$CE_{50}$ ( $\mu M$ )	nH	n
$\alpha 9^*:\alpha 10$ 1:1	$0.42 \pm 0.02$	$1.13 \pm 0.13$	5
$\alpha 9^*:\alpha 10$ 4:1	$0.54 \pm 0.02$	$1.57 \pm 0.13$	3
$\alpha 9:\alpha 10^*$ 1:1	$0.46 \pm 0.02$	$1.49 \pm 0.11$	5
$\alpha 9:\alpha 10^*$ 1:4	$0.63 \pm 0.03$	$1.08 \pm 0.11$	5

Los valores reportados son la media  $\pm$  SEM. \*:V13'T

## DISCUSIÓN

Aprovechando el hecho de que la mutación de las valinas 13' del dominio TM2 del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  aumenta la sensibilidad a la ACh, se pudo inferir que el nAChR recombinante  $\alpha 9\alpha 10$  es un pentámero constituido por dos subunidades  $\alpha 9$  y tres  $\alpha 10$ . También se ha demostrado que al menos a una relación 4:1 de ARNc mutado : salvaje inyectado, la estequiometría del receptor es la misma.

Para arribar a esta conclusión se asumió que:

- 1- La mutación V13'T no altera la estequiometría normal del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$ . Aunque no contamos con evidencias directas, parecería ser improbable que la mutación de residuos que miran al poro del canal pudiera afectar las interacciones entre subunidades de manera tal de inducir una estequiometría atípica.
- 2- Los distintos arreglos posibles de subunidades mutadas y salvajes dentro del pentámero son funcionalmente equivalentes.
- 3- La población de receptores homoméricos  $\alpha 9$  es no detectable en presencia de la subunidad  $\alpha 10$  (Elgoyhen et al., 2001).

Con el fin de poner a prueba la existencia de otros componentes que los descritos en las Figuras 20 y 21 se varió la relación de ARNc mutante:salvaje de cada subunidad (por ej.  $\alpha 9$  y  $\alpha 9^*$ ) coinyectada con su contraparte salvaje (por ej.  $\alpha 10$ ). Si bien el porcentaje de respuesta máxima de cada componente dependió de la relación de ARNc mutante:salvaje inyectado, el número de componentes y sus  $CE_{50}$  fueron independientes de dicha relación. Estas evidencias apoyan la conclusión de que las CCR de las Figuras 22 y 23 estarían compuestas por tres y cuatro componentes respectivamente.

Los porcentajes de respuesta máxima de los componentes para las distintas relaciones de ARNc inyectado se desviaron de lo predicho por una distribución binomial. Según la misma, por ejemplo, el porcentaje de respuesta máxima para el componente de receptor salvaje sería de un 25% para una relación 1:1  $\alpha 9:\alpha 9^*$ , pero la obtenida fue de ~58%. Un factor a tener en cuenta para explicar estas discrepancias es que la mutación V13'T podría afectar la eficiencia de ensamblado de las subunidades, provocando una menor expresión de receptores funcionales que contienen subunidades mutadas y por ende desviándose de una distribución binomial.

En la Parte I hemos caracterizado las mutaciones de tres anillos de residuos hidrofóbicos (17', 13' y 9') del dominio TM2 del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  a treonina. Todas las mutaciones producen un aumento en la sensibilidad a ACh, sin embargo para las 9' y 13' los cambios en la  $CE_{50}$  de las mutantes simples ( $\alpha 9^*\alpha 10$  y  $\alpha 9\alpha 10^*$ ) y dobles ( $\alpha 9^*10^*$ ) indicarían que en esas posiciones las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  contribuirían de manera asimétrica y no aditiva al cambio en la sensibilidad a ACh. La asimetría se evidenciaría por el hecho de que ambas mutantes simples presentan el mismo cambio en el valor de  $CE_{50}$ , a pesar de que las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  no pueden existir en una misma proporción en un complejo  $\alpha 9\alpha 10$  pentamérico. Resultados diferentes se obtuvieron con las mutaciones en la posición 17'. En ese caso, las mutantes simples produjeron una disminución en la  $CE_{50}$  de 2.6 y 5.1 veces para los receptores  $\alpha 9^*\alpha 10$  y  $\alpha 9\alpha 10^*$ , respectivamente. El cambio esperado para la mutante doble si ambas subunidades contribuyeran independientemente a la sensibilidad a ACh sería de 13.3 veces. Sorprendentemente, ese valor concuerda con el obtenido experimentalmente (13.4 veces, Tabla 2). Teniendo en cuenta esto, podría postularse que en esas posiciones ambas subunidades contribuyen independiente y simétricamente a la sensibilidad a ACh. Como ha sido reportado por Boorman y colaboradores (Boorman et al., 2000), los valores de  $CE_{50}$  calculados para las mutantes simples podrían ser usados para determinar la estequiometría del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$ . En este caso, dado que el cambio de  $CE_{50}$  de la mutante doble es de 13.4 veces, el cambio provocado por cada subunidad mutada incorporada al receptor sería igual a la raíz quinta de ese valor, es decir 1.68 veces. De acuerdo con esto, la existencia de dos subunidades mutadas provocaría un cambio de 2.82 veces, y de tres subunidades mutadas de 4.74 veces. Dado que el cambio en la  $CE_{50}$  de la mutante  $\alpha 9^*\alpha 10$  fue de 2.6 veces y de  $\alpha 9\alpha 10^*$  5.1 veces, se puede inferir que la estequiometría del receptor es  $(\alpha 9)_2(\alpha 10)_3$ . Esto concuerda con la estequiometría deducida a través del número de poblaciones de receptores que resultan de inyectar mezclas de ARNc de subunidades salvajes y mutantes, presentada anteriormente, reforzando la hipótesis de que el nAChR recombinante  $\alpha 9\alpha 10$  es un pentámero constituido por dos subunidades  $\alpha 9$  y tres  $\alpha 10$ .

Conociendo la estequiometría del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  surge el interrogante acerca del arreglo de estas subunidades alrededor del poro. Si bien no tenemos evidencias directas podríamos sugerir un probable arreglo espacial teniendo en cuenta que:

- ✓ La expresión de las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  en oocitos de *X. laevis* evidenció la formación de receptores homoméricos  $\alpha 9$  y heteroméricos  $\alpha 9\alpha 10$  funcionales pero no de receptores homoméricos  $\alpha 10$  (Elgoyhen et al., 1994; Elgoyhen et al., 2001). Los nAChRs  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  presentan una farmacología idéntica, pero difieren en sus propiedades biofísicas y en la magnitud de las respuestas macroscópicas producidas por la ACh, siendo 100 – 1000 veces mayores en el nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  que en el  $\alpha 9$ . Estos hallazgos podrían estar indicando que en el nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  la subunidad  $\alpha 9$  cumple un papel funcional y la subunidad  $\alpha 10$  un papel modulador de dicha funcionalidad.
- ✓ La estequiometría propuesta para los nAChRs neuronales compuestos por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  es  $(\alpha)_2 (\beta)_3$  (Anand et al., 1991; Boorman et al., 2000; Cooper et al., 1991). En este tipo de receptores las subunidades  $\alpha$  cumplirían un papel funcional y las  $\beta$  modulador. El arreglo de las subunidades en estos nAChRs parecería ser  $\alpha\beta\alpha\beta\beta$ , por analogía con el receptor tipo muscular (Karlin, 1983; Miyazawa, 2003).
- ✓ Las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  conforman una subfamilia de subunidades de nAChRs apartada evolutivamente del resto de las otras subfamilias, que se encuentra más cercana al ancestro evolutivo del cual derivan (Le Novère y Changeux, 1995b).

Estas evidencias nos permitirían proponer que, por analogía con el receptor neuronal heteromérico  $\alpha/\beta$ , el arreglo espacial de las subunidades del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  alrededor del poro del canal podría ser  $\alpha 9\alpha 10\alpha 9\alpha 10\alpha 10$ , en sentido horario y vista desde la brecha sináptica. Esta propuesta deberá ser evaluada en un futuro trabajo.



## **PARTE III**

### **CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE UNA $\alpha$ -CONOTOXINA QUE DISCRIMINA ENTRE LOS nAChRS $\alpha 9\alpha 10$ Y $\alpha 7$**

## INTRODUCCIÓN

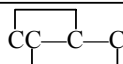
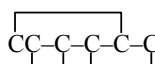
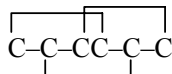
Las reglas que rigen la asociación de las subunidades nicotínicas para constituir receptores funcionales son muy amplias y permiten el ensamblado de subunidades  $\alpha$  para formar receptores homoméricos ( $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 9$ ) (Couturier et al., 1990; Elgoyhen et al., 1994; Gotti et al., 1994), receptores que contienen múltiples subunidades  $\alpha$  con ( $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ ,  $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ ,  $\alpha 3\alpha 5\beta 4$ ,  $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ ) (Balestra et al., 2000; Conroy y Berg, 1998; Conroy et al., 1992; Vernallis et al., 1993) o sin subunidades  $\beta$  suplementarias ( $\alpha 7\alpha 8$ ,  $\alpha 9\alpha 10$ ,  $\text{ALSD}\alpha 2$ ) (Elgoyhen et al., 2001; Gotti et al., 1994), receptores con un sólo tipo de subunidad  $\alpha$  y múltiples subunidades  $\beta$  ( $\alpha 3\beta 2\beta 4$ ,  $\alpha 3\beta 3\beta 4$ ) (Colquhoun y Patrick, 1997; Groot-Kormelink et al., 1998), receptores con múltiples subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  ( $\alpha 3\beta 2\beta 4\alpha 5$ ) (Gerzanich et al., 1998) y receptores heteroméricos formados por la combinación de subunidades  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ , o  $\alpha 6$  con subunidades  $\beta 2$  o  $\beta 4$  (Boulter et al., 1987; Deneris et al., 1988; Duvoisin et al., 1989; Gerzanich et al., 1997; Goldman et al., 1987). Como consecuencia de ello, el número potencial de receptores nicotínicos distintos resulta muy elevado. La determinación *in vivo* de la estructura y función de varios tipos de nAChRs ha resultado muy difícil, debido especialmente a la escasez de ligandos selectivos para los distintos subtipos de receptores.

### Las conotoxinas

El género *Conus* de caracoles marinos provee una gran variedad de toxinas peptídicas (entre 200-500 por especie) que son activas sobre canales iónicos activados por voltaje y por ligando, y sobre receptores acoplados a proteína G (McIntosh, 2000; McIntosh y Jones, 2001; McIntosh et al., 1999). Estas toxinas son los principios activos del veneno que el caracol usa para cazar a sus presas. Son pequeños péptidos que presentan una configuración específica, mantenida por uno o más puentes disulfuro. Aquellos con más de un puente disulfuro se denominan conotoxinas, las que a su vez se subdividen en superfamilias y familias según el patrón de distribución de dichos puentes en la molécula. Los miembros de una familia tienen el mismo patrón

de distribución de puentes disulfuro en la molécula y reconocen sitios homólogos en un determinado receptor. Estas familias, a su vez, se agrupan en superfamilias. Los miembros de una superfamilia presentan una secuencia conservada en sus precursores. La mayoría de los péptidos expresados en los venenos de los moluscos y peces pertenecientes al género *Conus* pertenecen a las superfamilias A, M y O. De éstos, las  $\alpha$ -conotoxinas ( $\alpha$ -CTx) y las  $\alpha$ A-conotoxinas, pertenecientes a la superfamilia A, son antagonistas competitivos de los receptores nicotínicos (McIntosh et al., 1999). Las  $\alpha$ -CTx se dividen en tres subfamilias de acuerdo a la distancia presente en la molécula madura entre la segunda y tercera cisteína y entre la tercera y la cuarta cisteína. Estas subfamilias se denominan:  $\alpha$ 4/7,  $\alpha$ 3/5 y un tercer grupo heterogéneo que incluye péptidos que no pertenecen a ninguna de las otras dos subfamilias.

**Tabla7 Clasificación de las conotoxinas en superfamilias y familias.**

Superfamilia	Patrón de cisteínas	Familia	Arreglo de puentes C-C
A	CC—C—C	$\alpha$	
	CC—C—C—C—C	$\alpha$ A	
M	CC—C—C—CC	$\mu, \psi$	
S	C-C-C-C-C-C—C-C-C	$\sigma$	
O	C—C—CC—C—C	$\omega, \delta, \mu O, \kappa$	

Las líneas horizontales representan secuencias de aminoácidos distintos a cisteína.

Una de las características más importantes de las conotoxinas, tanto desde el punto de vista neurobiológico como farmacológico, es su habilidad para discriminar entre miembros cercanos de una misma familia de canales iónicos. Gracias a ello, se las ha usado para definir formas moleculares a lo largo de una familia de canales iónicos (Olivera et al., 1994) y para estudiar la función biológica de determinados subtipos de canales. La alta especificidad que estos péptidos presentan es una característica particularmente interesante y explica el uso extensivo que se les ha dado a las conotoxinas como herramientas de investigación en neurobiología.

Trabajos recientes desarrollados sobre esta familia de compuestos han dado lugar a algunos de los antagonistas de los receptores nicotínicos más útiles, debido a su altísima selectividad para las interfaces de unión y a su mecanismo de acción competitivo. Entre ellas se destacan:

#### *Conotoxinas que actúan sobre los receptores musculares*

Las conotoxinas que actúan solamente sobre los receptores musculares derivan de las especies *C. geographus*, *ermineus*, *magus* y *striatus*. Estas toxinas pertenecen al grupo  $\alpha$  y a la subfamilia 3/5 (McIntosh et al., 1999). Entre ellas, las conotoxinas  $\alpha$ -CTx GI,  $\alpha$ -CTx MI y  $\alpha$ -CTx SIA presentan una alta selectividad por la interfase  $\alpha/\delta$  del receptor muscular embrionario murino, sin efectos sobre una variedad de receptores neuronales expresados en oocitos (Johnson et al., 1995).

La  $\alpha$ -CTx EI, derivada de *C. ermineus* (perteneciente a la subfamilia 4/7 del grupo  $\alpha$ A), presenta una preferencia similar por las interfases  $\alpha/\delta$  murinas, pero es mucho menos selectiva que las conotoxinas antes mencionadas.

#### *Conotoxinas que actúan sobre los receptores neuronales*

Todas estas conotoxinas pertenecen a la familia de  $\alpha$ -CTx, y la mayoría de ellas a la subfamilia 4/7.

La especie *C. imperialis* produce la  $\alpha$ -CTx ImI, que es selectiva para los receptores homoméricos de rata  $\alpha 7$  y  $\alpha 9$  (Johnson et al., 1995).

La  $\alpha$ -CTx MII, de *C. magus*, es selectiva para los receptores  $\alpha 3\beta 2$  de rata (Cartier et al., 1996) y la  $\alpha$ -CTx AuIB, de *C. aulicus*, es selectiva para las interfases  $\alpha 3\beta 4$  de rata (Luo et al., 1998)

#### **Clonado de la $\alpha$ -conotoxina PeIA de *Conus pergandis***

McIntosh y colaboradores clonaron a partir de ADN genómico de *Conus pergandis*, un gen que codifica para un nuevo péptido de la familia de las  $\alpha$ -conotoxinas (Figura 24).

La toxina fue denominada PeIA (“Pe” para designar la especie, *pergrandis*; “I” para designar el patrón de puentes disulfuro, y “A” para indicar que es la primera  $\alpha$ -conotoxina derivada de esta especie oriunda de las profundidades del Océano Pacífico occidental).

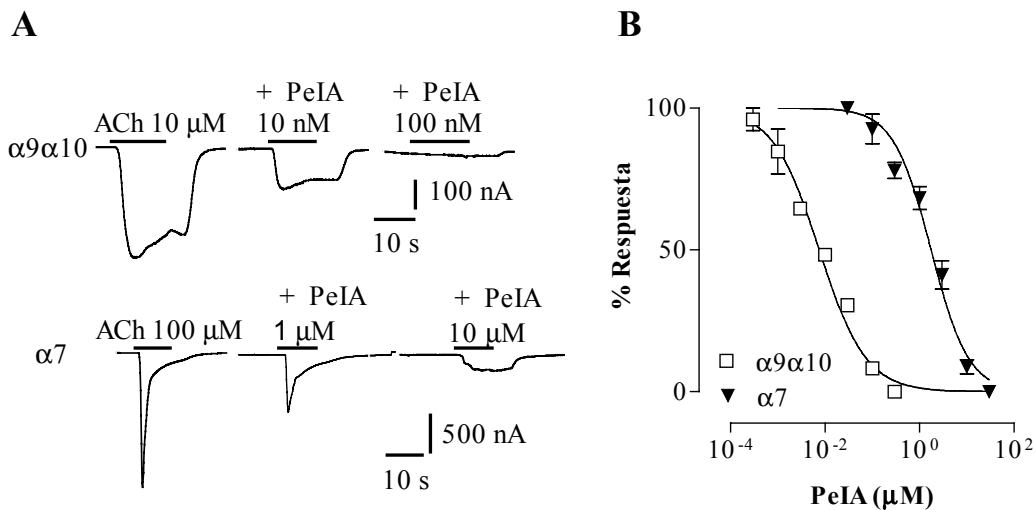
La caracterización funcional de  $\alpha$ -CTx PeIA se realizó con un péptido sintético, sintetizado a partir de la secuencia del ADNc del gen clonado.



## RESULTADOS

### La $\alpha$ -CTx PeIA discrimina entre los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ y $\alpha 7$

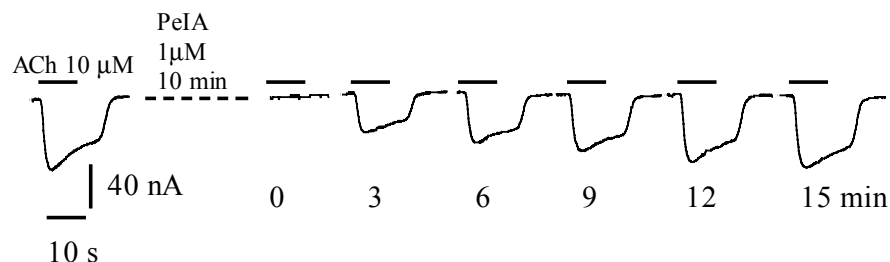
Dada la importancia del uso de las conotoxinas como herramientas farmacológicas para caracterizar nAChRs neuronales, se decidió analizar los efectos de la  $\alpha$ -CTx PeIA sobre diferentes nAChRs. La Figura 25A muestra trazos representativos de las respuestas a ACh, obtenidas en oocitos que expresan los nAChRs sensibles a  $\alpha$ -bungarotoxina,  $\alpha 9\alpha 10$  y  $\alpha 7$ , y el bloqueo de las mismas en presencia de  $\alpha$ -CTx PeIA. El bloqueo total de las respuestas colinérgicas del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  fue obtenido con  $\alpha$ -CTx PeIA 0.3  $\mu$ M, mientras que para  $\alpha 7$  fue necesario una concentración de 100  $\mu$ M. Las curvas de inhibición de la Figura 25B muestran que las corrientes evocadas por ACh en el nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  fueron bloqueadas en forma potente por  $\alpha$ -CTx PeIA, con una  $CI_{50}$  de  $6.9 \pm 0.5$  nM, (n=6). En el caso de  $\alpha 7$ , el valor de  $CI_{50}$ ,  $1.8 \pm 0.1$   $\mu$ M (n=5), resultó 2.5 órdenes de magnitud más alto que el obtenido para  $\alpha 9\alpha 10$ , indicando una alta selectividad de la toxina por este último.



**Figura 25 Efecto de  $\alpha$ -CTx PeIA sobre los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  y  $\alpha 7$ .** A, Trazos representativos de las respuestas a ACh, sola o en presencia de  $\alpha$ -CTx PeIA. B, Curvas de inhibición realizadas tras la coaplicación de ACh 10  $\mu$ M ( $CE_{50}$  para la ACh de  $\alpha 9\alpha 10$ ) o 100  $\mu$ M ( $CE_{50}$  para la ACh de  $\alpha 7$ ), y concentraciones crecientes de  $\alpha$ -CTx PeIA. Los oocitos fueron incubados con cada concentración de la toxina por 10 min, antes de la aplicación de ACh. Se graficaron las respuestas máximas obtenidas, expresadas como el porcentaje de la respuesta máxima obtenida con ACh. Se muestra la media y el error estándar, de 5 a 6 experimentos por grupo.

### El bloqueo de $\alpha$ -CTx PeIA sobre los receptores $\alpha 9\alpha 10$ es reversible

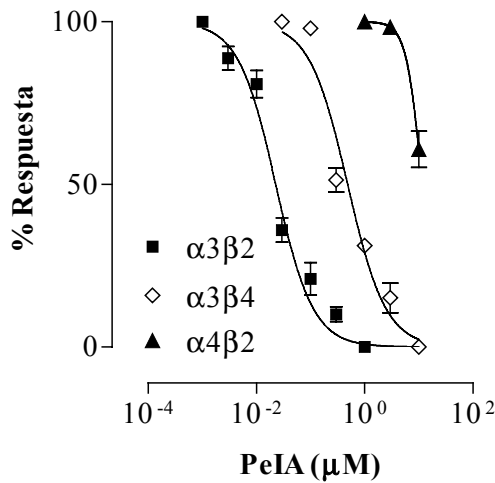
El bloqueo producido por  $\alpha$ -CTx PeIA en ambos receptores fue reversible. La Figura 26 muestra la cinética de lavado de la toxina para el nAChR  $\alpha 9\alpha 10$ . El efecto de  $\alpha$ -CTx PeIA se revirtió rápidamente: >50% de recuperación luego de 3 minutos de lavado con una solución salina y una recuperación total luego de 12-15 minutos.



**Figura 26 Cinética de lavado de  $\alpha$ -CTx PeIA sobre los receptores  $\alpha 9\alpha 10$ .** Luego de la obtención de una respuesta control a ACh 10  $\mu$ M,  $\alpha$ -CTx PeIA 1  $\mu$ M fue aplicada por 10 minutos a oocitos que expresaban el receptor  $\alpha 9\alpha 10$ . Luego, el oocito fue perfundido con solución salina libre de toxina, mientras se registraban las respuestas a ACh (n=3).

### Evaluación del efecto de $\alpha$ -CTx PeIA sobre los nAChRs neuronales insensibles a la $\alpha$ -bungarotoxina

Para evaluar el efecto de  $\alpha$ -CTx PeIA sobre los nAChRs neuronales insensibles a la  $\alpha$ -bungarotoxina, se realizaron CCR para la ACh en los receptores de rata  $\alpha 2\beta 4$ ,  $\alpha 2\beta 2$ ,  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 4\beta 4$ ,  $\alpha 3\beta 2$  y  $\alpha 3\beta 4$  (Figura 27 y Tabla 8). La  $\alpha$ -CTx PeIA no presentó actividad detectable sobre los receptores  $\alpha 2\beta 4$  (%Respuesta a ACh 10  $\mu$ M=  $98.2 \pm 2.1$ , n=3),  $\alpha 2\beta 2$  (%Respuesta a ACh 10  $\mu$ M=  $95.3 \pm 1.9$ , n=3) y  $\alpha 4\beta 4$  (%Respuesta a ACh 10  $\mu$ M=  $91.4 \pm 2.3$  %, n=3) a una concentración de 10  $\mu$ M, y sólo un  $40 \pm 2$  % de bloqueo sobre  $\alpha 4\beta 2$  a esa misma concentración. Por el contrario,  $\alpha$ -CTx PeIA resultó efectiva sobre los receptores que contienen la subunidad  $\alpha 3$ , con una mayor selectividad por el nAChR  $\alpha 3\beta 2$  (CI<sub>50</sub>=  $23 \pm 1$  nM, n=5) que por el  $\alpha 3\beta 4$  (CI<sub>50</sub>=  $0.48 \pm 0.03$   $\mu$ M, n=4).



**Figura 27 Efecto de  $\alpha$ -CTx PeIA sobre los receptores  $\alpha3\beta2$ ,  $\alpha3\beta4$  y  $\alpha4\beta2$ .** Curvas de inhibición obtenidas tras la coaplicación de ACh 10  $\mu$ M ( $CE_{50}$  para la ACh de  $\alpha3\beta2$ ), 100  $\mu$ M ( $CE_{50}$  para la ACh de  $\alpha3\beta4$ ) o 10  $\mu$ M ( $CE_{50}$  para la ACh de  $\alpha4\beta2$ ) y concentraciones crecientes de  $\alpha$ -CTx PeIA. Los oocitos fueron incubados con cada concentración de la toxina durante 10 minutos antes de la aplicación ACh. Se graficaron las respuestas máximas, expresadas como el porcentaje de la respuesta máxima a ACh. Se muestra la media y el error estándar de 4 a 5 experimentos por grupo.

**Tabla 8 Efecto de  $\alpha$ -CTx PeIA sobre los nAChRs**

	$CI_{50}$ (nM)	nH	n
$\alpha9\alpha10$	$6.98 \pm 0.54$	$-0.88 \pm 0.07$	5
$\alpha7$	$1800 \pm 100$	$-1.10 \pm 0.11$	4
$\alpha3\beta2$	$23 \pm 1$	$-1.25 \pm 0.13$	5
$\alpha3\beta4$	$480 \pm 30$	$-1.23 \pm 0.16$	3
$\alpha4\beta2$	$11600 \pm 800$	$-3.02 \pm 1.86$	3

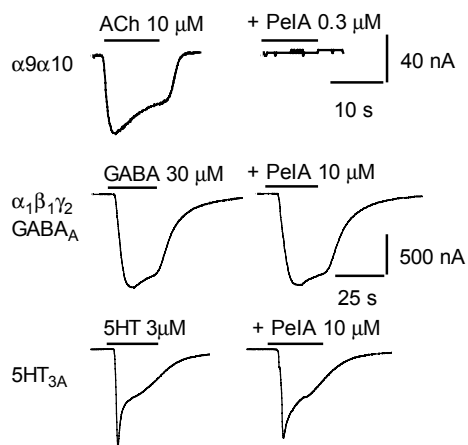
Los valores reportados son la media  $\pm$  error estándar. En el caso del nAChR  $\alpha4\beta2$ , la  $CI_{50}$  fue obtenida de la regresión no lineal

### La $\alpha$ -CTx PeIA es selectiva para los nAChRs

Los nAChRs pertenecen a la familia de receptores activados por ligando con asa de cisteínas, que también incluye a los receptores GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>C</sub>, glicinérgicos, 5-HT<sub>3</sub> y algunos receptores glutamatérgicos de invertebrados (Le Novère y Changeux, 1995a). Con el fin de evaluar la selectividad de  $\alpha$ -CTx PeIA por los nAChRs, se probó el efecto de la toxina sobre algunos miembros de esta familia: los receptores



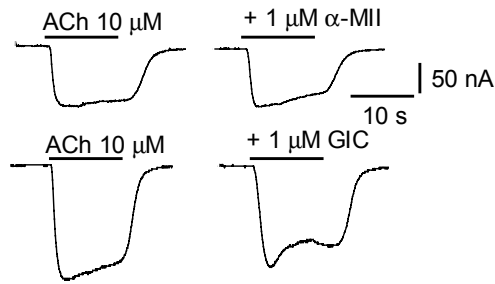
GABA<sub>A</sub> y 5-HT<sub>3A</sub> (Figura 28). Las respuestas producidas por 30 μM de ácido γ-amino butírico o 10 μM de serotonina en oocitos inyectados con los receptores recombinantes respectivos (n=4) no fueron afectadas por α-CTx PeIA a una concentración de 10 μM, confirmando la selectividad de las α-conotoxinas, provenientes de venenos de caracoles del género *Conus*, sobre los nAChRs.



**Figura 28 Efecto de α-CTx PeIA sobre los receptores α9α10, GABA<sub>A</sub> y 5HT<sub>3</sub>.** Trazos representativos de las respuestas a 10 μM ACh, 30 μM GABA o 3 μM 5-HT, solas o en presencia de α-CTx PeIA, en oocitos inyectados con los receptores recombinantes respectivos

### Las α-CTx MII y α-CTx GIC no tienen efecto sobre el receptor α9α10

La α-CTx PeIA presenta una alta homología de secuencia aminoacídica con las α-CTxs MII y GIC aisladas de *Conus magus* y *Conus geographus*, respectivamente (Tabla 9). Mientras α-CTx MII bloquea con una alta potencia a los nAChRs neuronales que contienen a las subunidades α3 y α6, α-CTx GIC tiene una alta selectividad por los receptores que contienen a la subunidad α6 (McIntosh et al., 2002). Al examinar el efecto de estas toxinas sobre oocitos que expresan el receptor α9α10, encontramos que a una concentración de 10 μM ni α-CTx MII ni α-CTx GIC bloquearon las respuestas colinérgicas del nAChR α9α10 (n=3) (Figura 29 y Tabla 9).



**Figura 29** Efecto de  $\alpha$ -CTx MII y  $\alpha$ -CTx GIC sobre el receptor  $\alpha 9\alpha 10$ . Trazos representativos de las respuestas a 10  $\mu$ M ACh, sola o en presencia de 1  $\mu$ M  $\alpha$ -CTx MII o  $\alpha$ -CTx GIC, en oocitos inyectados con el nAChR  $\alpha 9\alpha 10$ .

**Tabla 9.** Comparación de las secuencias aminoacídicas de las  $\alpha$ -conotoxinas

$\alpha$ -Conotoxina	Secuencia	CI <sub>50</sub> para $\alpha 9\alpha 10$ (nM)
PeIA	GCCSHPACSVNHPELC	6.7
MII	GCCSNPVCHLEHSNLC	>10,000
GIC	GCCSHPACAGNNQHIC	>10,000

## DISCUSIÓN

Mediante la utilización de secuencias conservadas presentes en los genes que codifican para conotoxinas del caracol marino *Conus pergandis*, McIntosh y colaboradores han clonado un nuevo péptido miembro de la familia de las  $\alpha$ -conotoxinas,  $\alpha$ -CTx PeIA. Esta es la primera toxina derivada de esta especie en ser caracterizada, y se agrega al arsenal de péptidos activos sobre los nAChRs aislados del género *Conus*.

Dado que en este estudio, se describen las propiedades de una versión sintética del péptido  $\alpha$ -CTx PeIA, es posible que la toxina nativa presente modificaciones post-traduccionales no evidenciables a partir de la inspección de la secuencia del gen. El mismo tiene dieciseis aminoácidos con dos puentes disulfuro y pertenece a la superfamilia A, al igual que la mayoría de los péptidos derivados del género *Conus* que afectan la función de los nAChRs. La separación de los puentes disulfuro en la molécula, cuatro aminoácidos en el primer asa de cisteínas y siete en el segundo, es característico de varias  $\alpha$ -conotoxinas de la familia  $\alpha$ 4/7 aisladas previamente, como las  $\alpha$ -CTxs MII y GIC, que son preferencialmente activas sobre nAChRs no musculares (McIntosh et al., 2002; McIntosh et al., 1999). La  $\alpha$ -CTx PeIA es selectivamente activa sobre los nAChRs sensibles a la  $\alpha$ -bungarotoxina,  $\alpha$ 9 $\alpha$ 10 y  $\alpha$ 7, pero actúa con mayor sensibilidad sobre los primeros.

Las células ciliadas cocleares, las externas y las internas durante el desarrollo, son los blancos principales de las fibras eferentes olivococleares (Guinan, 1996). La sinápsis de estas fibras en las células ciliadas está mediada por nAChRs  $\alpha$ 9 $\alpha$ 10 (Elgoyhen et al., 2001), uno de los pocos ejemplos demostrados de la función post-sináptica de los nAChR neuronales. Por este motivo, la realización de registros electrofisiológicos de células ciliadas internas resulta una herramienta muy valiosa para evaluar los efectos de  $\alpha$ -CTx PeIA sobre el nAChR nativo  $\alpha$ 9 $\alpha$ 10. Experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio en explantos de cóclea de rata demostraron que  $\alpha$ -CTx PeIA bloquea las respuestas evocadas por ACh en las células ciliadas internas con una  $CI_{50}$  similar a la hallada para los receptores recombinantes ( $4.4 \pm 0.5$  nM). Más aún, las corrientes sinápticas mediadas por el nAChR  $\alpha$ 9 $\alpha$ 10 y evocadas por la liberación pre-sináptica de ACh tras la aplicación de KCl 25 mM fueron bloqueadas

por  $\alpha$ -CTx PeIA 30 nM, indicando que la toxina es una herramienta valiosa para estudiar las respuestas mediadas por el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  *in vivo*.

En las neuronas del ganglio de la raíz dorsal de la médula se expresan múltiples subtipos de nAChRs, incluyendo a  $\alpha 7$ ,  $\alpha 3\beta 4$  y  $\alpha 4\beta 2$  (Genzen et al., 2001), y también se coexpresan las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  (Haberberger et al., 2004). Por otro lado, en linfocitos presentes en sangre periférica y en timocitos en desarrollo se ha demostrado la expresión de subunidades de nAChRs, incluyendo a  $\alpha 2$ - $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$  y  $\beta 4$ , que podrían participar en diversos pasos de la regulación de la respuesta inmune (Mihovilovic y Roses, 1993; Peng et al., 2004; Sato et al., 1999). En queratinocitos, se expresan las subunidades  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$ , y se ha propuesto su participación en la regulación de la homeostasis de la piel (Arredondo et al., 2002; Chernyavsky et al., 2004; Kurzen et al., 2005; Nguyen et al., 2000).  $\alpha$ -CTx PeIA es la primera toxina reportada que bloquea con alta afinidad las respuestas colinérgicas del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$ . Además, el hallazgo de que esta toxina sea 260 veces más sensible para  $\alpha 9\alpha 10$  que para  $\alpha 7$ , indica que  $\alpha$ -CTx PeIA podría resultar una herramienta útil para diferenciar las respuestas mediadas por los receptores  $\alpha 9\alpha 10$  o  $\alpha 7$  en aquellos tejidos donde ambos receptores se expresan.

Los caracoles marinos carnívoros del género *Conus* constituyen una vasta fuente de péptidos activos que tienen por blanco de acción a los nAChRs. Un componente esencial de los venenos de estos caracoles son toxinas que actúan sobre el nAChR muscular (McIntosh et al., 1999). La razón por la cual esta especie produce un veneno con alta afinidad por los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  es un interrogante. *C. pergandis* se encuentra en las profundidades del Océano Pacífico, y los caracoles de su género se alimentan generalmente de peces, moluscos y / o gusanos. Se sabe que el genoma del pez *Fugu rubripes* contiene tres candidatos para el gen de la subunidad nicotínica  $\alpha 7$ , dos para  $\alpha 8$  y cuatro para  $\alpha 9$ . Además, se ha descrito que el genoma de este pez contiene la familia más grande de subunidades de nAChRs de vertebrados, hasta hoy descrita (Jones et al., 2003). A pesar de que ninguna de las secuencias para los nAChRs de *Fugu* muestra una alta identidad con las subunidades  $\alpha 10$  de mamífero o aves, tres subunidades tipo  $\alpha 9$  poseen sitios de glicosilación como la subunidad  $\alpha 10$  de vertebrados superiores (Jones et al., 2003), sugiriendo que estas subunidades similar  $\alpha 9$  podrían coensamblarse para formar nAChRs funcionales, similares a los receptores

$\alpha 9$  y / o  $\alpha 9\alpha 10$  de vertebrados superiores. Los nAChRs  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  de vertebrados superiores median la inhibición colinérgica eferente en las células ciliadas cocleares y vestibulares (Elgoyhen et al., 1994; Elgoyhen et al., 2001; Fuchs, 1996; Lustig et al., 2001; Sgard et al., 2002). El órgano de la línea lateral de peces recibe una inervación eferente mediada posiblemente por un receptor similar al presente en las células ciliadas de la cóclea (Dawkins et al., 2004; Russell, 1971). La orientación apropiada de las células ciliadas mecanosensoriales a lo largo del órgano de la línea lateral de un pez es esencial para que el animal pueda sentir los movimientos direccionales del agua. Este sistema sensorial parece ser importante en varias tareas comportamentales como la captura de la presa, la orientación con respecto a señales del medio externo, la navegación en condiciones de baja luminosidad, y la mediación de las interacciones con otros animales (Flock y Wersall, 1962; Pohlmann et al., 2004). Así, el bloqueo de la modulación eferente de la actividad del órgano de la línea lateral por las toxinas del género *Conus* podría facilitar los hábitos predatorios de estos caracoles.

La  $\alpha$ -CTx PeIA muestra una similitud de secuencia considerable con las  $\alpha$ -conotoxinas de la familia 4/7,  $\alpha$ -CTx MII y  $\alpha$ -CTx -GIC (Nicke et al., 2004). La comparación de la estructura de estas tres  $\alpha$ -CTxs (Tabla 9), indica que las cuatro cisteínas están ubicadas en la misma posición con la misma conectividad de puente disulfuro. Además, una prolina altamente conservada y la ubicación idéntica de una histidina y una asparragina, ambas supuestas de iniciar una  $\alpha$ -hélice en GIC y MII, indican que el esqueleto peptídico de  $\alpha$ -CTx PeIA es muy similar al de las otras dos conotoxinas. Más aún, si se las considera como un grupo y se las compara dentro del mismo, se encuentran únicamente cuatro sustituciones no conservativas, remarcadas en la Tabla 9. Las toxinas de la familia 4/7 tienen un patrón estructural común. Sus esqueletos polipeptídicos parecen ser virtualmente idénticos: la estructura canónica de la  $\alpha$ -hélice y las dos vueltas  $\beta$  son características estructurales prominentes de la familia. Dada la cercana identidad de los esqueletos peptídicos, la habilidad de los diferentes péptidos 4/7 de *Conus* para discriminar entre distintos subtipos de nAChRs neuronales podría deberse a la hipervariabilidad de las cadenas laterales de sus aminoácidos (McIntosh et al., 1999). A pesar de que las tres conotoxinas, PeIA, MII y GIC, tienen una alta afinidad por los nAChRs  $\alpha 3\beta 2$  (Cartier et al., 1996; McIntosh et al., 2002), sólo PeIA tiene alta afinidad por  $\alpha 9\alpha 10$ . De esta forma, los sitios de  $\alpha 3\beta 2$  y  $\alpha 9\alpha 10$  reconocidos por estas tres toxinas serían diferentes, permitiendo estas

discrepancias selectivas. Por ello, los aminoácidos resaltados en la Tabla 9 podrían ser los determinantes estructurales responsables de la alta selectividad de la  $\alpha$ -CTx PeIA por los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$ .

## CONCLUSIONES

- Los aminoácidos Leu 9' y Val 13', ubicados en la zona central del dominio TM2, juegan un papel clave en el *gating* del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$ .
- Las interacciones hidrofóbicas de las cadenas laterales de estos residuos participarían en la creación de una compuerta de naturaleza hidrofóbica. El residuo Val 13' es el que contribuiría mayormente a crear una barrera energética al paso de los iones.
- El nAChR recombinante  $\alpha 9\alpha 10$  es un pentámero constituido por dos subunidades  $\alpha 9$  y tres  $\alpha 10$ .
- La  $\alpha$ -CTx PeIA es activa selectivamente sobre los nAChRs sensibles a la  $\alpha$ -bungarotoxina,  $\alpha 9\alpha 10$  y  $\alpha 7$ , pero actúa con mayor sensibilidad sobre los primeros. Gracias a ello, podría resultar una herramienta útil para diferenciar las respuestas mediadas por los receptores  $\alpha 9\alpha 10$  o  $\alpha 7$  en aquellos tejidos donde ambos receptores se coexpresan.

## BIBLIOGRAFÍA

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

Akabas MH, 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.

Anand R, Conroy WG, 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.

Arredondo J, Nguyen VT, Chernyavsky AI, Bercovich D, Orr-Urtreger A, Kummer W, Lips K, Vetter DE and Grando SA (2002) Central role of alpha7 nicotinic receptor in differentiation of the stratified squamous epithelium. *J Cell Biol* **159**:325-36.

Ashmore JF (1987) A fast motile response in guinea pig outer hair cells: the cellular basis of the cochlear amplifier. *J. Physiol. (Lond.)* **388**:323-347.

Ashmore JF (1994) The cellular machinery of the cochlea. *Experimental Physiology* **79**:113-134.

Balestra B, Vailati S, Moretti M, Hanke W, Clementi F and Gotti C (2000) Chick optic lobe contains a developmentally regulated alpha2alpha5beta2 nicotinic receptor subtype. *Mol Pharmacol* **58**:300-11.

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 USA* **79**:4466-70.

Behe P, Stern P, Wyllie DJA, Nassar MA, Schoepfer R and Colquhoun D (1995)



Determination of NMDA NR1 subunit copy number in recombinant NMDA receptor. *Proc. R. Soc. Lond (Biol)* **262**:205-213.

Bertrand D, Devillers-Thiery A, Revah F, Galzi JL, Hussy N, Mulle C, Bertrand S, Ballivet M and Changeux JP (1992) Unconventional pharmacology of a neuronal receptor mutated in the channel domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:1261-1265.

Bertrand D, Galzi JL, Devillers-Thiery A, Bertrand S and Changeux JP (1993a) 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.

Bertrand D, Galzi J-L, Devillers-Thiéry A, Bertrand S and Changeux J-P (1993b) Stratification of the channel domain in neurotransmitter receptors. *Current Opinion in Cell Biology* **5**:688-693.

Bertrand S, Devillers-Thiery A, Palma E, Buisson B, Edelstein SJ, Corringer P-J, Changeux J-P and Bertrand D (1997) Paradoxical allosteric effects of competitive inhibitors on neuronal alpha-7 nicotinic receptor mutants. *NeuroReport* **8**:3591-3596.

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.

Blount P and Merlie JP (1989) Molecular basis of the two nonequivalent ligand binding sites of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* **3**:349-357.

Bonfante-Cabarcas R, Swanson KL, Alkondon M and Albuquerque EX (1996) Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. IV. Regulation by external  $Ca^{++}$  of  $\alpha$ -bungarotoxin-sensitive receptor function and of rectification induced by internal  $Mg^{++}$ . *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **277**:432-444.

Boorman J, Groot-Kormelink P and Sivilotti L (2000) Stoichiometry of human recombinant neuronal nicotinic receptors containing the  $\alpha 3$  subunit expressed in *Xenopus* oocytes. *Journal of Physiology (London)* **529**:565-577.

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, Goldman D, Martin G, Treco D, Heinemann S and Patrick J (1986) Isolation of a cDNA clone coding for a possible neural nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunit. *Nature* **319**:368-74.

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.

Bouzat C, Bren N and Sine SM (1994) Structural basis of the different gating kinetics of fetal and adult acetylcholine receptors. *Neuron* **13**:1395-402.

Bouzat C, Gumilar F, del Carmen Esandi M and Sine SM (2002) Subunit-selective contribution to channel gating of the M4 domain of the nicotinic receptor. *Biophys J* **82**:1920-9.

Bouzat C, Gumilar F, Spitzmaul G, Wang HL, Rayes D, Hansen SB, Taylor P and Sine SM (2004) Coupling of agonist binding to channel gating in an ACh-binding protein linked to an ion channel. *Nature* **430**:896-900.

Bregestovski PD, Miledi R and Parker I (1979) Calcium conductance of acetylcholine-induced endplate channels. *Nature* **279**:638-639.

Brejck K, van Dijk WJ, Klaassen RV, Schuurmans M, van Der OJ, Smit AB and Sixma TK (2001) Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding

domain of nicotinic receptors. *Nature* **411**:269-276.

Brisson AU, P. N. T (1984) Tubular crystals of acetylcholine receptor. *Journal of Cell Biology* **99**:1202-1211.

Buisson B, Vallejo YF, Green WN and Bertrand D (2000) The unusual nature of epibatidine responses at the  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptor. *Neuropharmacology* **39**:2561-2569.

Callister RJ, Keast JR and Sah P (1997)  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels in rat otic ganglion cells: role of  $Ca^{2+}$  entry via  $Ca^{2+}$  channels and nicotinic receptors. *Journal of Physiology (London)* **500**:571-582.

Campos-Caro A, Sala S, Ballesta J, Vicente-Agullo F, Criado M and Sala F (1996) A single residue in the M2-M3 loop is a major determinant of coupling between binding and gating in neuronal nicotinic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:6118-23.

Campos-Caro A, Smillie FI, Domínguez del Toro E, Rovira JC, Vicente-Agulló F, Chapuli J, Juárez JM, Sala S, Sala F and Ballesta JJ (1997) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors on bovine chromaffin cells: cloning, expression, and genomic organization of receptor subunits. *Journal of Neurochemistry* **68**:488-497.

Cartier GE, Yoshikami D, Gray WR, Luo S, Olivera BM and McIntosh JM (1996) A new  $\alpha$ -conotoxin which targets  $\alpha 3\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Biological Chemistry* **271**:7522-7528.

Castro NG and Albuquerque EX (1995)  $\alpha$ -Bungarotoxin-sensitive hippocampal nicotinic receptor channel has a high calcium permeability. *Biophysical Journal* **68**:516-524.

Chang Y, Wang R, Barot S and Weiss DS (1996) Stoichiometry of a recombinant GABA A receptor. *Journal of Neuroscience* **16**:5415-5424.

Chang Y and Weiss D (1999) Allosteric activation mechanism of the alpha 1 beta 2 gamma 2 GABA A receptor revealed by mutation of the conserved M2 leucine. *Biophysical Journal* **77**:2542 - 2551.

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

Changeux J (1990a) in *Fidia Research Foundation Neuroscience Award Lectures* (Changeux JP LR, Purves D and Bloom FE ed) pp 21-168, Raven Press.

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

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

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

Chernyavsky AI, Arredondo J, Marubio LM and Grando SA (2004) Differential regulation of keratinocyte chemokinesis and chemotaxis through distinct nicotinic receptor subtypes. *J Cell Sci* **117**:5665-79.

Chiara DCC, J. B. (1997) Identification of amino acids contributing to high and low affinity d- tubocurarine sites in the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of Biological Chemistry* **272**:32940-32950.

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 BN, Labarca C, Davidson N and A. LH (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 D (1998) Binding, gating, affinity and efficacy: the interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors. *Br J Pharmacol* **125**:924-47.

Colquhoun LM and Patrick JW (1997) Alpha3, beta2, and beta4 form heterotrimeric neuronal nicotinic acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *Journal of Neurochemistry* **69**:2355-62.

Conroy WG and Berg DK (1995) Neurons can maintain multiple classes of nicotinic receptors distinguished by different subunit compositions. *Journal of Biological Chemistry* **270**:4424-4431.

Conroy WG and Berg DK (1998) Nicotinic receptor subtypes in the developing chick brain: appearance of a species containing the alpha4, beta2, and alpha5 gene products. *Mol Pharmacol* **53**:392-401.

Conroy WG, Vernallis AB and Berg DK (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 PJ, Bertrand S, Galzi JL, Devillers-Thiery A, Changeux JP and Bertrand D (1999) Mutational analysis of the charge selectivity filter of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* **22**:831-43.

Corringer PJ, Le Novere, N., & Changeux, J. P. (2000) Nicotinic receptors at the

amino acid level. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **40**:431-458.

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  $\alpha$ -BTX. *Neuron* **5**:847-856.

Cymes GD, Grosman C and Auerbach A (2002) Structure of the transition state of gating in the acetylcholine receptor channel pore: a phi-value analysis. *Biochemistry* **41**:5548-55.

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 (1996) *The cochlea*. Springer-Verlag, New York.

Dawkins R, Keller SL and Sewell WF (2004) Pharmacology of acetylcholine-mediated cell signaling in the lateral line organ following efferent stimulation. *J Neurophysiol.*

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

Deneris ES, Connolly J, Boulter J, Wada E, Wada K, Swanson LW, Patrick J and Heinemann S (1988) Primary structure and expression of beta 2: a novel subunit of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron* **1**:45-54.

Duvoisin RM, Deneris ES, 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.

Dwyer TM, Adams DJ and Hille B (1980) The permeability of the endplate channel to

organic cations in frog muscle. *Journal of General Physiology* **75**:469-492.

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

Elgoyhen AB, Vetter DE, Katz E, Rothlin CV, Heinemann SF 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.

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

Erostequi C, Nenov AP, Norris CH and Bobbin RP (1994a) Acetylcholine activates a K<sup>+</sup> conductance permeable to Cs<sup>+</sup> in guinea pig outer hair cells. *Hear Res* **81**:119-29.

Erostequi C, Norris CH and Bobbin RP (1994b) In vitro pharmacologic characterization of a cholinergic receptor on outer hair cells. *Hearing Research* **74**:135-47.

Evans M (1996) Acetylcholine activates two currents in guinea-pig outer hair cells. *J. Physiol.* **491**:563-578.

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

Fieber LA and Adams DJ (1991) Acetylcholine-evoked currents in cultured neurones dissociated from rat parasympathetic cardiac ganglia. *J Physiol (Lond)* **434**:215-37.

Filatov GN and White MM (1995) The role of conserved leucines in the M2 domain

of the acetylcholine receptor in channel gating. *Mol. Pharmacol.* **48**:379-384.

Flock A and Wersall J (1962) A study of the orientation of the sensory hairs of the receptor cells in the lateral line organ of fish, with special reference to the function of the receptors. *J Cell Biol* **15**:19-27.

Forsayeth JR and Kobrin E (1997) Formation of oligomers containing the beta3 and beta4 subunits of the rat nicotinic receptor. *J Neurosci* **17**:1531-8.

Fuchs PA (1996) Synaptic transmission at vertebrate hair cells. *Curr Opin Neurobiol* **6**:514-9.

Fuchs PA and Murrow BW (1992a) Cholinergic inhibition of short (outer) hair cells of the chick's cochlea. *J. Neurosci.* **12**:800-809.

Fuchs PA and Murrow BW (1992b) A novel cholinergic receptor mediates inhibition of chick cochlear hair cells. *Proc. R. Soc. Lond. B* **248**:35-40.

Fucile S, Palma E, Mileo AM, Miledi R and Eusebi F (2000) Human neuronal Threonine-for-leucine-248 alpha7 mutant nicotinic acetylcholine receptors are highly calcium permeable. *PNAS* **97**:3643-3648.

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

Galzi JL, Devillers-Thiery A, Hussy N, Bertrand S, Changeux JP 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 JL, Edelstein SJ and Changeux JP (1996b) The multiple phenotypes of allosteric receptor mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*



*States of America* **93**:1853-1858.

Garcia-Guzman M, Sala F, Sala S, Campos-Caro A, Stühmer W, Gutierrez L and Criado M (1995) alpha-Bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors on bovine chromaffin cells: Molecular cloning, functional expression and alternative splicing of the alpha7 subunits. *Eur J Neurosci* **7**:647-655.

Genzen JR, Van Cleve W and McGehee DS (2001) Dorsal root ganglion neurons express multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *J Neurophysiol* **86**:1773-82.

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

Gerzanich V, Kuryatov A, Anand R and Lindstrom J (1997) "Orphan" alpha6 nicotinic AChR subunit can form a functional heteromeric acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol* **51**:320-7.

Gerzanich V, Wang F, Kuryatov A and Lindstrom J (1998) alpha 5 Subunit alters desensitization, pharmacology, Ca<sup>++</sup> permeability and Ca<sup>++</sup> modulation of human neuronal alpha 3 nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **286**:311-20.

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  $\delta$  subunit is labeled by [<sup>3</sup>H]chlorpromazine. *Proc. Nac. Acad. Sci.* **83**:2719-2723.

Giraudat J, Devillers-Thiery A, Auffray C, Rougeon F and Changeux JP (1982) Identification of a cDNA clone coding for the acetylcholine binding subunit of *Torpedo marmorata* acetylcholine receptor. *Embo J* **1**:713-7.

Goldman D, Deneris E, Luyten W, Kochhar A, Patrick J and Heinemann S (1987) Members of a nicotinic acetylcholine receptor gene family are expressed in different regions of the mammalian central nervous system. *Cell* **48**:965-73.

Göldner FM, Dineley KT and Patrick JW (1997) Immunohistochemical localization of the nicotinic acetylcholine receptor subunit  $\alpha 6$  to dopaminergic neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area. *NeuroReport* **8**:2739-2742.

Gotti C, Hanke W, Maury K, Moretti M, Ballivet M, Clementi F and Bertrand D (1994) Pharmacology and biophysical properties of alpha 7 and alpha 7-alpha 8 alpha-bungarotoxin receptor subtypes immunopurified from the chick optic lobe. *Eur J Neurosci* **6**:1281-91.

Grando SA (2000) Autoimmunity to keratinocyte acetylcholine receptors in pemphigus. *Dermatology* **201**:290-5.

Groot-Kormelink P, Boorman JP and Sivilotti L (2001) Formation of functional  $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$  human neuronal nicotinic receptors in *Xenopus* oocytes: a reporter mutation approach. *British Journal of Pharmacology* **134**:789-796.

Groot-Kormelink PJ, luyten WHML, Colquhoun D and Sivilotti LG (1998) A reporter mutation approach shows incorporation of the "orphan" subunit beta3 into a functional nicotinic receptor. *Journal of Biological Chemistry* **273**:15317-15320.

Grosman C and Auerbach A (2000b) Asymmetric and independent contribution of the second transmembrane segment 12' residues to diliganded gating of acetylcholine receptor channels. *J. Gen. Physiol.* **115**:637-651.

Grosman C and Auerbach A (2000c) Kinetic,mechanistic and structural aspects of unliganded gating of acetylcholine receptor channels. *J. Gen. Physiol.* **115**:621-635.

Grosman C, Salamone FN, Sine SM and Auerbach A (2000) The extracellular linker

of muscle acetylcholine receptor channels is a gating control element. *Journal of General Physiology* **116**:327-339.

Guinan JJ (1996) Efferent Physiology, in *The Cochlea* (Dallos P, Popper AN and Fay RR eds) pp 435-502, Springer, New York.

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

Haberberger RV, Bernardini N, Kress M, Hartmann P, Lips KS and Kummer W (2004) Nicotinic acetylcholine receptor subtypes in nociceptive dorsal root ganglion neurons of the adult rat. *Auton Neurosci* **113**:32-42.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B and Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**:85-100.

Heidmann T and Changeux J (1979) Fast kinetic studies on the interaction of a fluorescent agonist with the membrane-bound acetylcholine receptor from *Torpedo marmorata*. *European Journal of Biochemistry* **94**:255-279.

Heidmann T and Changeux J (1979b) Fast kinetic studies on the allosteric interactions between acetylcholine receptor and local anesthetic binding sites. *European Journal of Biochemistry* **94**:281-296.

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

Housley GD and Ashmore JF (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.

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.

Hudspeth A (1985) The cellular basis of hearing: the biophysics of hair cells. *Science* **230**:745-752.

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 aminoacids determine the acetylcholine receptor channel conductance. *Nature* **335**:645-648.

Imoto K, Methfessel, C., Sakmann, B., Mishina, M., Mori, Y., Konno, T., Fukuda, K., Kurasaki, M., Bujo, H., Fujita, Y., & Numa, S. (1986) Location of a delta-subunit region determining ion transport through the acetylcholine receptor channel. *Nature* **324**:670-674.

Jackson M (1984) Spontaneous openings of the acetylcholine receptor channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A* **81**:3901-3904.

Jagger DJ, Griesinger CB, Rivolta MN, Holley MC and Ashmore JF (2000) Calcium signalling mediated by the  $\alpha 9$  acetylcholine receptor in a cochlear cell line from the immortal mouse. *Journal of Physiology (London)* **527**:49-54.

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

Jones AK, Elgar G and Sattelle DB (2003) The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the pufferfish, *Fugu rubripes*. *Genomics* **82**:441-51.

Jones S, Sudweeks S and Yakel J (1999) Nicotinic receptors in the brain: correlating

physiology with function. *Trends Neurosci* **22**:555-561.

Takehata 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 PN 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 (2002) Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nature Reviews Neuroscience* **3**:102-114.

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

Katz B and Thesleff S (1957) A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. *Journal of Physiology* **138**:63-68.

Katz E, Verbitsky M, Rothlin CV, Vetter DE, Heinemann SF and Elgoyhen AB (2000) High calcium permeability and calcium block of the  $\alpha 9$  nicotinic acetylcholine receptor. *Hearing Res.* **141**:117-128.

Kistler JS, R. M (1981) Crystalline arrays of membrane-bound acetylcholine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A* **78**:3678-3682.

Klink R, de Kerchove d'Exaerde A, Zoli M and Changeux J-P (2001) Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. *Journal of Neuroscience* **21**:1452-1463.

Kubalek E, Ralston S, Lindstrom J and Unwin N (1987) Location of subunits within the acetylcholine receptor by electron image analysis of tubular crystals from *Torpedo marmorata*. *J. Cell Biol.* **105**:9-18.

Kurzen H, Berger H, Jager C, Hartschuh W and Maas-Szabowski N (2005) Alpha 9 acetylcholine receptors are essential for epidermal differentiation. *Exp Dermatol* **14**:155.

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

Le Novère N and Changeux J (1995a) Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J. Molec. Evol.* **40**:155-172.

Le Novère N and Changeux JP (1995b) Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J Mol Evol* **40**:155-72.

Le Novère N, Grutter T and Changeux J-P (2002) Models of the extracellular domain of the nicotinic receptor and of agonist- and Ca<sup>2+</sup>-binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A* **99**:3210-3215.

Le Novère N, Zoli M and Changeux J (1996) Neuronal nicotinic receptor  $\alpha 6$  subunit mRNA is selectively concentrated in catecholaminergic nuclei of the rat brain. *European Journal of Neuroscience* **8**:2428-2439.

Léna C, d'Exaerde AD, Cordero-Erausquin M, Le Novère N, Arroyo-Jiménez MdM and Changeux J-P (1999) Diversity and distribution of nicotinic acetylcholine receptors in the locus ceruleus neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A* **96**:12126-12131.

Leonard RJ, Labarca CG, Charnet 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.

Lewis CA (1979) Ion-concentration dependence of the reversal potential and the single channel conductance of ion channels at the frog neuromuscular junction. *Journal of Physiology (London)* **286**:417-445.

Lewis TM, Harkness PC, Sivilotti LG, Colquhoun D and Millar N (1997) Heterologous expression of a neuronal nicotinic receptor yields channels whose properties are dependent on host cell type. *Journal of Physiology (London)* **505**:299-306.

Lewis TM, Sivilotti LG, Colquhoun D, Gardiner RM, Schoepfer R and Rees M (1998) Properties of human glycine receptors containing the hyperekplexia mutation alpha1(K276E), expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* **507 ( Pt 1)**:25-40.

Lieberman MC (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 ER, Tygat J and Hess P (1992) Subunit Stoichiometry of a Mammalian K<sup>+</sup> Channel Determined by Construction of Multimeric cDNAs. *Neuron* **9**:861-871.

Listerud M, Brussaard AB, Devay P, Colman DR and Role LW (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 CW 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.

Luo S, Kulak JM, Cartier GE, Jacobsen RB, Yoshikami D, Olivera BM and McIntosh JM (1998)  $\alpha$ -Conotoxin AuIB selectively blocks  $\alpha 3\beta 4$  nicotinic acetylcholine receptors and nicotine-evoked norepinephrine release. *Journal of Neuroscience* **18**:8571-8579.

Lustig LR, Peng H, Hiel H, Yamamoto T and Fuchs PA (2001) Molecular cloning and mapping of the human nicotinic acetylcholine receptor alpha10 (CHRNA10). *Genomics* **73**:272-83.

Lynch JW, Rajendra S, Pierce KD, Handford CA, Barry PH and Schofield PR (1997) Identification of intracellular and extracellular domains mediating signal transduction in the inhibitory glycine receptor chloride channel. *EMBO Journal* **16**:110-120.

Maconochie DJ, Fletcher GH and Steinbach JH (1995) The conductance of the muscle nicotinic receptor channel changes rapidly upon gating. *Biophysical Journal* **68**:483-490.

Maison SF and Liberman MC (2000) Predicting vulnerability to acoustic injury with a noninvasive assay of olivocochlear reflex strength. *J Neurosci* **20**:4701-7.

Martinez K and Corringer P (2000) Structural differences in the two agonist binding sites of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor revealed by time-resolved fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* **39**:6979-6990.

Mathie A, Cull-Candy SG and Colquhoun D (1987) Single-channel and whole-cell currents evoked by acetylcholine in dissociated sympathetic neurons of the rat. *Proceedings of the Royal Society London B. Biol. Sci.* **232**:239-248.

McGehee DS and Role LW (1995) Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annual Review of Physiology* **57**:521-46.

McIntosh JM (2000) Toxin antagonists of the neuronal nicotinic acetylcholine



receptor., in *Neuronal Nicotinic Receptors* (Clementi F, Fornasari, D., & Gotti, C ed) pp 455-476, Springer Verlag, Berlin Heidelberg.

McIntosh JM, Dowell C, Watkins M, Garrett JE, Yoshikami D and Olivera BM (2002) Alpha-conotoxin GIC from *Conus geographus*, a novel peptide antagonist of nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* **277**:33610-5.

McIntosh JM and Jones RM (2001) Cone venom-from accidental stings to deliberate injection. *Toxicon* **39**:1447-1451.

McIntosh JM, Santos AD and Olivera BM (1999) *Conus* peptides targeted to specific nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Annual Review of Biochemistry* **68**:59-88.

McNiven AI, Yuhas WA and Fuchs PA (1996) Ionic dependence and agonist preference of an acetylcholine receptor in hair cells. *Auditory Neurosci.* **2**:63-77.

Mihovilovic M and Roses AD (1993) Expression of alpha-3, alpha-5, and beta-4 neuronal acetylcholine receptor subunit transcripts in normal and myasthenia gravis thymus. Identification of thymocytes expressing the alpha-3 transcripts. *J Immunol* **151**:6517-24.

Miyazawa A, Fujiyoshi Y and Unwin N (2003) Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* **423**:949 - 955.

Miyazawa A, Fujiyoshi, Y., Stowell, M., & Unwin, N. (1999) Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall. *Journal of Molecular Biology* **288**:765-786.

Monod J, Wyman J and Changeux J (1965) On the nature of allosteric transitions. *J. Mol. Biol.* **12**:88-118.

Mulle C, Choquet D, Korn H and Changeux JP (1992a) Calcium influx through

nicotinic receptor in rat central neurons: its relevance to cellular regulation. *Neuron* **8**:135-43.

Mulle C, Léna C and Changeux J-P (1992b) Potentiation of nicotinic receptor response by external calcium in rat central neurons. *Neuron* **8**:937-945.

Neher E and Sakmann B (1976) Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers. *Nature* **260**:799-802.

Nelson ME, Kuryatov A, Choi CH, Zhou Y and Lindstrom J (2003) Alternate stoichiometries of alpha4 beta2 nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* **63**:332-341.

Neuhaus R and Cachelin AB (1990) Changes in the conductance of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor channel induced by magnesium. *Proceedings of the Royal Society London B. Biol. Sci.* **241**:78-84.

Nguyen VT, Ndoye A and Grando SA (2000) Novel human alpha9 acetylcholine receptor regulating keratinocyte adhesion is targeted by Pemphigus vulgaris autoimmunity. *Am J Pathol* **157**:1377-91.

Nicke A, Wonnacott S and Lewis RJ (2004) Alpha-conotoxins as tools for the elucidation of structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Eur J Biochem* **271**:2305-19.

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, 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.

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

Oliver D, Klocker N, Schuck J, Baukowitz T, Ruppertsberg JP and Fakler B (2000) Gating of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels controls fast inhibitory synaptic transmission at auditory outer hair cells. *Neuron* **26**:595-601.

Olivera BM, Miljanich GP, Ramachandran J and Adams ME (1994) Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annu Rev Biochem* **63**:823-67.

Palma E, Fucile S, Barabino B, Miledi R and Eusebi F (1999) Strychnine activates neuronal alpha7 nicotinic receptors after mutations in the leucine ring and transmitter binding site domains. *PNAS* **96**:13421-13426.

Palma E, Miledi AM, Eusebi F and Miledi R (1996) Threonine-for-leucine mutation within domain M2 of the neuronal a7 nicotinic receptor converts 5-hydroxytryptamine from antagonist to agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:11231-11235.

Panicker S, Cruz H, Arrabit C and Slesinger PA (2002) Evidence for a centrally located gate in the pore of a serotonin-gated ion channel. *J Neurosci* **22**:1629-39.

Papke RL, 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 a7 subtype. *Neurosci. Letters* **213**:201-204.

Paton WDM and Rang HP (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 RB, Yates GK and Johnstone BM (1989) Outer hair receptor currents and sensorineural hearing loss. *Hearing Res.* **42**:47-72.

Peng H, Ferris RL, Matthews T, Hiel H, Lopez-Albaitero A and Lustig LR (2004) Characterization of the human nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha (alpha) 9 (CHRNA9) and alpha (alpha) 10 (CHRNA10) in lymphocytes. *Life Sci* **76**:263-80.

Pohlmann K, Atema J and Breithaupt T (2004) The importance of the lateral line in nocturnal predation of piscivorous catfish. *J Exp Biol* **207**:2971-8.

Prince R and Sine S (1999) Acetylcholine and epibatidine binding to muscle acetylcholine receptors distinguish between concerted and uncoupled models. *Journal of Biological Chemistry* **274**:19623-19629.

Rajendra S, Vandenberg RJ, Pierce KD, Cunningham AM, French PW, Barry PH and Schofield PR (1995) The unique extracellular disulfide loop of the glycine receptor is a principal ligand binding element. *EMBO Journal* **14**:2987-2998.

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

Rayas D, De Rosa MJ, Bartos M and Bouzat C (2004) Molecular basis of the differential sensitivity of nematode and mammalian muscle to the anthelmintic agent levamisole. *J Biol Chem* **279**:36372-81.

Raymond V, Sattelle, DB (2002) Novel animal-health drug targets from ligand-gated chloride channels. *Nature Reviews Drug Discovery* **1**:427-436.

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

Reynolds JA and Karlin A (1978) Molecular weight in detergent solution of acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *Biochemistry* **17**:2035-8.

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

Rubin M and Changeux J (1966) On the nature of allosteric transitions: implications of non-exclusive ligand binding. *Journal of Molecular Biology* **21**:265-274.

Russell IJ (1971) The pharmacology of efferent synapses in the lateral-line system of *Xenopus laevis*. *J Exp Biol* **54**:643-58.

Rust G, Burgunder JM, Lauterburg TE and Cachelin AB (1994) Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits genes in the rat autonomic nervous system. *European Journal of Neuroscience* **6**:478-485.

Sakman B, Patlak J and Neher E (1980) Single acetylcholine-activated channels show burst-kinetics in presence of desensitizing concentrations of agonist. *Nature* **286**:71-73.

Sakmann B (1992) Elementary steps in synaptic transmission revealed by currents through single ion channels. *Neuron* **8**:613-629.

Sands SB and Barish ME (1991) Calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channels in PC12 cells. *Brain Res* **560**:38-42.

Sands SB, Costa ACS and Patrick JW (1993) Barium permeability of neuronal

nicotinic receptor  $\alpha 7$  expressed in *Xenopus* oocytes. *Biophysical Journal* **65**:2614-2621.

Sargent PB (2000) The distribution of neuronal nicotinic acetylcholine receptors, in *Neuronal Nicotinic Receptors* (Clementi F, Fornasari, D., & Gotti, C., ed) pp 163-192, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Sato KZ, Fujii T, Watanabe Y, Yamada S, Ando T, Kazuko F and Kawashima K (1999) Diversity of mRNA expression for muscarinic acetylcholine receptor subtypes and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in human mononuclear leukocytes and leukemic cell lines. *Neurosci Lett* **266**:17-20.

Scharf B, Magnan J and Chays A (1997) On the role of the olivocochlear bundle in hearing: 16 case studies. *Hear Res* **103**:101-22.

Séguéla P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA and Patrick JW (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.

Sgard F, Charpantier E, Bertrand S, Walker N, Caput D, Graham D, Bertrand D and Besnard F (2002) A novel human nicotinic receptor subunit,  $\alpha 10$ , that confers functionality to the  $\alpha 9$ -subunit. *Molecular Pharmacology* **61**:150-159.

Sine SM, Kreienkamp, H. J., Bren, N., Maeda, R., & Taylor, P (1995) Molecular dissection of subunit interfaces in the acetylcholine receptor: identification of determinants of  $\alpha$ -conotoxin M1 selectivity. *Neuron* **15**:205-211.

Taglietti V and Toselli M (1988) A study of stretch-activated channels in the membrane of frog oocytes: interactions with  $Ca^{2+}$  ions. *J. Physiol. (Lond)* **407**: 311-328.

Takeuchi A and Takeuchi N (1960) On the permeability of the endplate membrane

during the action of transmitter. *J. Physiol. (London)* **154**:52-67.

Taylor P (1990) Cholinergic agonists, in *The pharmacological basis of therapeutics* (Goodman-Gilman R, Nies, Taylor ed) pp 122-149, Pergamon Press, New York.

Toyoshima CU, N. (1990) Three-dimensional structure of the acetylcholine receptor by cryoelectron microscopy and helical image reconstruction. *Journal of Cell Biology* **111**:2623-2635.

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

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

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

Unwin N, Miyazawa A and Fujiyoshi Y (2002) Activation of the nicotinic acetylcholine receptor involves a switch in conformation of the alpha subunits. *J. Mol. Biol.* **319**:1165 - 1176.

Verbitsky M, Rothlin C, Katz E and Elgoyhen AB (2000) Mixed nicotinic-muscarinic properties of the  $\alpha 9$  nicotinic receptor. *Neuropharmacology* **39**(13):2525-32.

Vernallis AB, Conroy WG and Berg DK (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, Luetjens CW, Patrick J and Dani JA (1992) Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron* **8**:127-34.

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

Vetter DE, Liberman MC, Mann J, Barhanin J, Boulter J, Brown MC, Saffioti-Kolman S, Heinemann SF and Elgoyhen AB (1999) Role of alpha9 nicotinic ACh receptor subunits in the development and function of cochlear efferent innervation. *Neuron* **23**:93-103.

Villarroel A and Sakmann B (1992) Threonine in the selectivity filter of the acetylcholine receptor channel. *Biophys J* **62**:196-205; discussion 205-8.

Weisstaub N, Vetter DE, Elgoyhen AB and Katz E (2002) The alpha9 alpha10 nicotinic acetylcholine receptor is permeable to and is modulated by divalent cations. *Hearing Research* **167**:122-135.

Wessler I, Kirkpatrick CJ and Racke K (1998) Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. *Pharmacol. Ther.* **77**:59-79.

Wilson GG and Karlin A (1998) The location of the gate in the acetylcholine receptor channel. *Neuron* **20**:1269-81.

Wilson GG and Karlin A (2001) Acetylcholine receptor channel structure in the resting, open and desensitized states probed with the substituted-cysteine-accessibility method. *PNAS* **98**:1241-1248.

Winslow RL and Sachs MB (1987) Effect of electrical stimulation of the crossed olivocochlear bundle on auditory nerve response to tones in noise. *J Neurophysiol* **57**:1002-21.

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.

Xie YC, J. B. (2001) Contributions of Torpedo nicotinic acetylcholine receptor gamma Trp-55 and delta Trp-57 to agonist and competitive antagonist function. *Journal of Biological Chemistry* **276**:2417-2426.

Zhang H and Karlin A (1997) Identification of acetylcholine receptor channel-lining residues in the M1 segment of the beta-subunit. *Biochemistry* **36**:15856-64.

Zhong W, Gallivan, J. P., Zhang, Y., Li, L., Lester, H. A., & Dougherty, D. A. (1998) From ab initio quantum mechanics to molecular neurobiology: a cation-pi binding site in the nicotinic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A* **95**:12088-12093.

Zhou Z and Neher E (1993) Calcium permeability of nicotinic acetylcholine receptor channels in bovine adrenal chromaffin cells. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* **425**:511-517.

Zwart R and Vijverberg HP (1998) Four pharmacologically distinct subtypes of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Molecular Pharmacology* **54**:1124-31.