

03081

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
PROYECTO ACADÉMICO: MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA BÁSICA
SEDE ACADÉMICA: CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA

ESTRUCTURA-FUNCIÓN DE UN MOTIVO EN EL DOMINIO CITOPLÁSMICO
DEL RECEPTOR NICOTÍNICO DE ACETILCOLINA

Tesis que para obtener el grado de
DOCTOR EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
presenta
MAESTRA EN I.B.B. CONSUELO MORGADO VALLE

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

03081

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2002

SUMMARY. The nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) is the prototype of the superfamily of ligand-gated channels. nAChRs are formed by 5 subunidades, and each subunidad presents 4 transmembrane segments (M1-M4). The intracellular facing loop between M3 and M4 contains phosphorylation sites and sites of contact between the nAChR and cytoskeleton elements.

Using the program MOTIF to analyze the loop between M3 and M4 of several ligand-gated channels, we have found a pattern of 5 aminoacids, in a block of 21, that is strictly conserved in 82 subunidades of the nAChRs. The motif presented the sequence RXPTH(X)₁₄P, and was localized in the segment between M3 and the phosphorylation sites. Inspection of the sequences from banks of cloned proteins showed that the motif is also present in another family of proteins, namely, the catalasas. Catalasas are enzymes localized in peroxisomes that metabolize H₂O₂ to produce H₂O and O₂ and are formed by 2 or 4 subunidades. Twenty catalasas from different sources had the same motif localized in the nAChRs.

To explore the functional significance of this pattern of conserved aminoacids, we studied the expression of neuronal $\alpha 2\beta 4$ AChR and its electrophysiological characteristics in *Xenopus* oocytes, and compared these parameters with $\alpha 2\beta 4$ neuronal AChR in which the motif was mutated.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN. El receptor nicotínico de acetilcolina (RnACh) es el prototipo de una superfamilia de canales activados por ligando. El RnACh está formado por cinco subunidades, cada una de las cuales contiene cuatro segmentos transmembranales (M1-M4). El asa intracelular que une M3 y M4 contiene sitios de fosforilación y sitios de contacto entre el RnACh y el citoesqueleto.

Por medio del programa MOTIF y enfocados en el asa entre los segmentos M3 y M4 de varios canales activados por ligando, encontramos un patrón de cinco aminoácidos en un bloque de 21 que está estrictamente conservado en 82 subunidades del RnACh. El motivo presenta la siguiente secuencia: RXPXTH(X)₁₄P y está localizado entre M3 y los sitios de fosforilación. La búsqueda de este motivo en los bancos de datos de proteínas clonadas mostró que este se encuentra presente en otra familia de proteínas: las catalasas. Las catalasas son enzimas localizadas en peroxisomas que metabolizan H₂O₂ para producir H₂O y O₂ y están formadas por 2 o 4 subunidades. Veinte catalasas de diferentes organismos poseen el mismo motivo localizado en los RnACh.

Para explorar el significado funcional de este patrón conservado de aminoácidos, en el presente trabajo estudiamos la expresión del RnACh neuronal $\alpha 2\beta 4$ y sus características electrofisiológicas en ovocitos de *Xenopus*, y las comparamos con aquellas características que presentaron los receptores en los cuales el motivo fue mutado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCION

Es en el principio del siglo XXI y el genoma humano ha sido totalmente secuenciado!!! Sin embargo, muchos genomas bacterianos y de otros organismos ya habian sido determinados, lo que significa una gran cantidad de información disponible. Además de excitante, este hecho representa un reto para los investigadores: entender como las proteínas codificadas en el genoma se coordinan para realizar todas las funciones biológicas necesarias para la vida. En las últimas tres décadas, se han realizado avances significativos de la tecnología que han permitido formular nuevas estrategias para asumir este reto. Estos avances tecnológicos se reflejan en el desarrollo de nuevas y sofisticadas técnicas de biología molecular, ingeniería genética, bioquímica, biofísica y biología estructural, entre otras. El uso de estos avances técnicos ha permitido conocer detalles de la unión, señalización y catálisis de las proteínas.

El número de estructuras tridimensionales proteicas resueltas se ha incrementado rápidamente, siendo actualmente más de 10, 000 registradas en el Protein Data Bank (PDB; Bernstein *et al.*, 1977). Estas estructuras, por sí solas revelan mucho acerca de los mecanismos moleculares asociados con una función particular y, tomando todo ese cuerpo de información, podemos estudiar la evolución de las estructuras y funciones proteicas.

La primera clasificación del plegamiento de las proteínas, guiándose sólo por un reconocimiento visual de la existencia de patrones de plegamiento recurrentes se realizó a mediados de los 70's (Wetlaufer, 1973; Levitt y Chothia, 1976). Actualmente se cuenta con diferentes sistemas de clasificación automatizados para reconocer las similitudes entre proteínas, algunos de los cuales son usados rutinariamente para comparar la estructura recién resuelta de una proteína con las estructuras existentes en el PDB (Wodak, 1996; Holm y Sander, 1993; Gibrat *et al.*, 1996)

En la actualidad, todas las proteínas conocidas se pueden agrupar dentro de aproximadamente 1200 familias de secuencias, reconociéndose en estas cerca de 500 plegamientos distintos (Zhang y DeLisi, 2001). Mas aún, el número de familias de secuencia en la naturaleza es probablemente un orden de magnitud más grande que el número de ellas depositadas en el PDB, pero muchas de las familias que actualmente no están representadas, resultarán tener plegamientos que ya se conocen. De hecho, se ha calculado que el número de

plegamientos desconocidos es solamente dos veces mayor que el número de plegamientos reportados (Zhang y DeLisi, 2001).

Del dato anterior deriva la aseveración de que la estructura es un rasgo más conservado que la secuencia, lo que facilita el establecimiento de relaciones evolutivas muchas veces ocultas a nivel de secuencia. Este hecho apoya la hipótesis de que el número de familias de proteínas es finito, con un mínimo estimado de sólo 1000 patrones de plegamiento diferentes (Chothia, 1993).

Para entender y mapear el universo de estructuras proteicas, es necesario coleccionar y clasificar estas estructuras en un esquema racional. Este tipo de "taxonomía molecular" ha sido llevada a cabo por varios grupos que han desarrollado esquemas que ayudan a clasificar las estructuras basándose en métodos que comparan las secuencias y las estructuras (SSAP, Taylor y Orengo, 1989; DALI, Holm y Sander, 1993). Otros, proveen listas de relaciones estructurales estrechas (VAST, Hogue *et al.*, 1996; DALI, Holm y Sander, 1996; Overington *et al.*, 1993; DIAL, Sowdhamini *et al.*, 1996). Varios grupos han ido mas allá, en un esfuerzo por generar esquemas de clasificación mas completos, que provean descripciones de la estructura así como relaciones filogenéticas (SCOP, Murzin *et al.*, 1995; CATH, Orengo *et al.*, 1997; HOMSTRAD, Mizuguchi *et al.*, 1998).

Actualmente, mucho de nuestro conocimiento acerca del mundo de las proteínas proviene del análisis de secuencias. Sin embargo, la comparación de secuencias no identifica muchas de las relaciones que emergen una vez que la estructura de la proteína se conoce. Brenner *et al.* (1998) mostró que el algoritmo BLAST encuentra sólo un 10% de las relaciones conocidas en el PDB. La versión iterativa PSI-BLAST (Altschul *et al.*, 1997) que analiza muchas de las características de una familia dada, es mas sensible, pero pierde aún muchas de esas relaciones. Con esta información se hace claro que el diccionario definitivo de las familias de proteínas requerirá datos estructurales para poder establecer todas las relaciones entre familias.

Actualmente se consideran dos tipos de clasificaciones de la estructura de las proteínas (Thornton *et al.*, 1999). La clasificación filogenética busca establecer un árbol evolutivo, relacionando las diferentes familias proteicas de acuerdo a su historia evolutiva (por ejemplo: agrupando a las proteínas que poseen un ancestro común). Teóricamente, esta sería una manera correcta de clasificar (excluyendo fenómenos complejos tales como el

intercambio genético entre especies), que gradualmente irá teniendo sentido mientras más estructuras se resuelvan.

Otro tipo de clasificación se basa en la descripción profunda de la estructura de la proteína (en rasgos tales como la clase, la arquitectura y el tipo de plegamiento), sin hacer referencia a su pasado evolutivo, para agrupar las proteínas basándose exclusivamente en datos estructurales. Este tipo de clasificación no es absoluta, pero es útil. En la práctica se ha observado que las proteínas agrupadas en una misma familia basándose en la comparación de la secuencia, adoptan el mismo plegamiento tridimensional.

La manera más común para organizar los datos de las estructuras tridimensionales de las proteínas ha sido siguiendo un esquema jerárquico, agrupando primero a las proteínas de acuerdo a sus relaciones filogenéticas y luego haciendo pequeños grupos basados en el plegamiento, en su arquitectura o en la descripción de su estructura. Este tipo de clasificación sería más exitosa si las características en las que se basa para clasificar fueran discretas en lugar de formar un continuo.

Para facilitar la clasificación, se han tomado en cuenta algunas características sobresalientes de las proteínas, como la existencia de dominios estructurales.

Estructura básica de las proteínas

La estructura de una proteína puede ser descrita en cuatro niveles diferentes. La *estructura primaria* se refiere al arreglo lineal de los residuos de aminoácidos a lo largo de la cadena polipeptídica, así como a la localización de uniones covalentes tales como puentes disulfuro. La estructura secundaria denota el plegamiento de regiones de la cadena polipeptídica en estructuras regulares tales como α -hélices y hojas β -plegadas. La *estructura terciaria* incluye el arreglo espacial de todas las regiones de la proteína, incluyendo las α -hélices y hojas β -plegadas, así como todas las demás interacciones no-covalentes que aseguran el plegamiento característico de una sola cadena polipeptídica. Dichas interacciones no covalentes pueden ser los puentes de hidrógeno y las interacciones de van der Waals. Finalmente, la estructura cuaternaria se refiere a las interacciones no-covalentes que unen varias cadenas polipeptídicas para formar una sola proteína.

Aún cuando la estructura primaria de los polipéptidos es lineal, la mayoría se pliega en formas esféricas compactas dando lugar a las llamadas proteínas globulares. Otras

proteínas adoptan formas de bastón, por lo que son llamadas proteínas fibrosas, tales como la colágena, la principal proteína estructural del cartilago, los tendones y los vasos sanguíneos.

Estructura secundaria: α -hélice

Dentro de las proteínas existen regiones plegadas de manera única e irregular, y regiones con un plegamiento característico. Uno de estos plegamientos característicos es la α -hélice, descrita por primera vez en 1951 por Linus Pauling y Robert B. Corey, quienes notaron que los segmentos polipéptidicos compuestos por ciertos aminoácidos tienden a arreglarse en conformaciones helicoidales. Una α -hélice característica tiene 3.6 aminoácidos por vuelta, cada aminoácido representa un avance de aproximadamente 0.15 nm a lo largo del eje de la hélice y las cadenas laterales de cada residuo están posicionadas a lo largo de los lados externos del cilindro.

No todas las secuencias de aminoácidos son adecuadas para adoptar este plegamiento. Múltiples aminoácidos adyacentes que poseen la misma carga se repelen con tal fuerza que impiden formar uniones entre ellos que les permitan incorporarse a una α -hélice. Por ejemplo, en una solución salina a pH 7, una cadena de alaninas, aminoácido cuyas cadenas laterales son no-polares, formarán una α -hélice espontáneamente. Por otro lado, una cadena de lisinas (poli-lisina), aminoácido con cadena lateral cargada positivamente, no formará un α -hélice en esas condiciones y permanecerá plegada al azar, condición conocida como un "random coil". Sin embargo, a pH 12, condición en la cual la mayoría de los aminoácidos no se encuentran protonados, la poli-lisina formará espontáneamente una α -hélice.

Algunas cadenas laterales (como la del triptófano, por ejemplo) son tan grandes que no son aceptadas fácilmente dentro del arreglo inflexible de un α -hélice. La prolina es un aminoácido raramente encontrado en medio de una hélice α debido a que, su grupo imino no posee un átomo de hidrógeno unido, por lo que cuando se incorpora dentro del enlace peptídico no puede participar en la formación de puentes de hidrógeno que caracteriza a un α -hélice. Otra razón es que su anillo puede causar que la cadena del α -hélice se gire. Sin embargo, la prolina puede ser encontrada al principio o al final de una α -hélice.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Estructura secundaria: hoja β -plegada

Otro plegamiento regular encontrado en muchas proteínas es la hoja β -plegada. Esta estructura es creada por una serie de puentes de hidrógeno entre residuos de diferentes cadenas polipeptídicas, o entre residuos de diferentes regiones de un polipéptido plegado. En las hojas β -plegada antiparalelas, las hebras corren en direcciones opuestas, de tal modo que la dirección $\text{NH}_2 \rightarrow \text{COOH}$ de una cadena se aparea con otra en la dirección $\text{COOH} \rightarrow \text{NH}_2$. En contraste en las hojas β paralelas ambas hebras corren en la misma dirección. Al aumentar el número de hebras participantes aumenta la rigidez de la hoja.

Estructura supersecundaria y dominios

Si bien el análisis de la secuencia primaria de las proteínas ha hecho posible obtener información elemental de estas, también ha revelado la importancia del estudio de otros niveles de organización estructural, como los motivos y los dominios, los cuales han sido denominados en su conjunto estructura supersecundaria.

Frecuentemente, los términos motivo (en inglés motif), módulo, dominio, unidad estructural y repetición (en inglés repeat) son usados indistintamente. Con el fin de unificar la terminología, Baron *et al.* (1991), han sugerido definir como dominio "una subregión de una cadena polipeptídica que es autónoma, en el sentido de que posee todas las características de una proteína globular completa". En un sentido más amplio, Doolittle (1995) ha definido un dominio como un segmento que puede plegarse independientemente del resto de la secuencia. Debido a que la base para la formación de un dominio es la cohesión entre las cadenas laterales de sus residuos, las cuales estabilizan su estructura, el número de residuos necesarios es un parámetro crítico. Se requieren entre 50 y 100 residuos para la formación de un dominio, aunque algunos segmentos más pequeños pueden ser estabilizados al plegarse alrededor de centros hemo, formando puentes disulfuro apropiados o, en el caso de unidades repetitivas pequeñas, al entrar en contacto unas con otras.

Cabe señalar que en algunos trabajos de cristalografía se utiliza frecuentemente el término pliegue (fold) para referirse a un dominio, los investigadores orientados al análisis de secuencias utilizan el término dominio cuando se refieren a un motivo o secuencia guía, donde casi siempre dicha secuencia caracteriza al motivo (Doolittle, 1995).

Al analizar las proteínas y los genes que las codifican, se ha observado que los dominios proteicos están frecuentemente codificados por un solo exón. Patthy (1987) ha utilizado el término módulo para definir este tipo de dominios producto de la recombinación y duplicación de un mismo exón. Sin embargo, Doolittle (1995) considera que esta definición es restrictiva y menciona que basta con que un dominio ocurra en dos grupos de proteínas no-homólogas o que esté en una localización claramente diferente en proteínas homólogas para ser considerado evolutivamente móvil. Algunos dominios han sido tan exitosos al adaptarse estructural y funcionalmente que están presentes en numerosas proteínas sin relación funcional aparente.

Como se mencionó anteriormente, otro término utilizado en el estudio comparativo de las secuencias de aminoácidos es el de motivo, el cual hace referencia a un patrón de aminoácidos total o parcialmente conservados que se presenta con la misma disposición en un grupo de proteínas. Los aminoácidos que forman el patrón común del motivo pueden ser contiguos o ubicarse alternados con aminoácidos variables en una sección de la proteína. Esta disposición de aminoácidos en la secuencia primaria usualmente se asocia a una estructura tridimensional característica, que está inmersa en un dominio de la proteína y que se puede distinguir claramente dentro de este.

Del análisis de secuencias se ha observado que las proteínas frecuentemente contienen dominios pequeños claramente distinguibles, los cuales pueden ocurrir en otras proteínas en otras combinaciones. Estos dominios pueden ser interpretados como "unidades de evolución". Los datos estructurales también revelan que algunas proteínas presentan unidades estructurales compactas perfectamente distinguibles en la secuencia, cuyo plegamiento es independientemente. Estos dominios pueden estar unidos entre sí covalentemente, generando proteínas multi-modulares, las cuales pueden tener contactos amplios o mínimos entre los diferentes dominios. Un dominio puede también estar insertado dentro de otro, rompiendo la estructura original para formar un dominio discontinuo. Debido a esta información, se ha observado que una clasificación bastante apropiada de la estructura de las proteínas es aquella basada en la organización de las proteínas a nivel de dominios.

Sin embargo, la subdivisión de dominios dificulta más la clasificación, ya que la estructura tridimensional de muchas proteínas no se ha determinado. Por otra parte, diferentes algoritmos para identificar dominios pueden arrojar diferentes asignaciones para

la definición de dominio (Swindells, 1995; Siddiqui y Barton, 1995; Islam *et al.*, 1995; Holm y Sander, 1993; Jones *et al.*, 1998). Las definiciones, sin embargo, seguramente se refinarán a medida que se disponga de más datos estructurales de un mayor número de proteínas.

La clasificación basada en dominios se ha construido a partir de la observación de que las proteínas globulares están organizadas siguiendo una jerarquía estructural dada por estructuras secundarias características, como las α -hélices y las hojas- β , donde residuos consecutivos adoptan conformaciones muy similares. La estructura terciaria está formada entonces por el empaquetamiento de elementos de estructura secundaria dando como resultado uno o varias unidades globulares compactas llamadas dominios (Wetlaufer, 1973). Algunas proteínas contienen varias cadenas polipeptídicas arregladas en una estructura cuaternaria.

La similitud estructural de las proteínas se ha encontrado no sólo a nivel de la proteína completa (en los llamados dominios), sino también a nivel subestructural. Se han observados elementos de la estructura secundaria que se combinan en arreglos geométricos específicos. Los tres arreglos supersecundarios básicos también llamados motivos son α -“hairpin”, β -“hairpin” y la unidad $\beta\alpha\beta$ (Richardson, 1981; Taylor y Thornton, 1984; Sibanda y Thornton, 1985). Algunos otros motivos subestructurales más grandes están constituidos por la combinación de unidades básicas de estructura secundaria.

Plegamiento y función

La estructura nativa es un requerimiento absoluto para la función de una proteína. Si bien el conocimiento del plegamiento por sí solo, generalmente no ha dado respuestas definitivas a todas las preguntas relacionadas con la función (Martin *et al.*, 1998), el reconocer la existencia de un número pequeño de patrones de plegamiento básicos nos permite tener un marco de referencia para organizar el gran número de funciones biológicas de las proteínas (Thornton *et al.*, 1999).

Hasta la fecha, se considera que la principal ruta de evolución funcional de una proteína ha sido la mutación localizada (Zhang y DeLisi, 2001). Los residuos cambian en respuesta a modificaciones de las necesidades funcionales, pero los mecanismos bioquímicos básicos y el plegamiento tridimensional general no se altera. En la mayoría de las familias proteicas existen, de manera natural, polimorfismos concentrados en residuos que modulan la

especificidad de la actividad biológica, pero al parecer el mejoramiento en la eficiencia y la especificidad, a través de modificaciones en la arquitectura del sitio activo de las proteínas, es la manera en que se rige la evolución proteica (Parham *et al.*, 1988).

Uno de los principales objetivos de los biólogos estructurales en la actualidad es el establecimiento de un mapa que explique como se lleva a cabo y que relación existe entre el plegamiento y la función. La clasificación del plegamiento es sólo el primer paso, ya que para entender los principios que subyacen a éste, se necesitará entender las relaciones existentes entre residuos dentro de la proteína. El enfoque principal deberá ser la existencia de motivos subestructurales que son piezas comunes para la construcción de los diferentes plegamientos. Los datos disponibles muestran que quizá la mayoría de estos motivos ya han sido observados en las estructuras de las proteínas ya resueltas, por lo que los esfuerzos que se realicen para conocer las unidades fundamentales de plegamiento, facilitarán el desarrollo de métodos más efectivos para la predicción de estructura.

En la mayoría de los casos, el estudio de una proteína particular incluye tanto la caracterización funcional como la estructural, lo que facilita el establecimiento de relaciones estructura-función. Si bien, para estudiar funcionalmente a una proteína se cuenta con una amplia gama de técnicas, su estudio a nivel estructural es más complejo. La cristalografía por rayos X es la técnica mas usada actualmente para determinar la estructura tridimensional de las proteínas a una resolución atómica. La otra técnica ampliamente usada es la resonancia magnética nuclear, la cual posee algunas limitaciones como el tamaño de las moléculas a ser caracterizadas estructuralmente. Sin embargo, típicamente cerca de un 20-40% de todas las proteínas, incluyendo las proteínas de membrana, son difíciles de cristalizar, por lo que su estructura tridimensional no ha sido resuelta y parece no estar accesible mediante los procedimientos de cristalografía (Miao, 2001).

Dentro de las proteínas de membrana que no han podido ser cristalizadas se encuentran los receptores iónicos y dentro de ellos el receptor nicotínico de acetilcolina, uno de los receptores mejor caracterizados funcional y estructuralmente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RECEPTORES NICOTINICOS DE ACETILCOLINA

Los receptores nicotínicos de acetilcolina (RnACh) son canales catiónicos activados por ligando que pertenecen a una superfamilia de receptores que incluye los receptores de ácido γ -amino butírico tipo A (GABA_A), de glicina y de 5-hidroxitriptamina tipo 3A y 3B (5-HT_{3A} y 5-HT_{3B}). Cada receptor está compuesto por cinco subunidades cuyo arreglo espacial delimita un poro acuoso central insertado en la membrana. Las subunidades de estos receptores son homólogas ya que poseen secuencias similares y la distribución de sus segmentos hidrofóbicos transmembranales es equivalente (Karlin y Akabas, 1995).

Los RnACh son quizá los receptores más ampliamente estudiados desde el punto de vista funcional y estructural. Estos receptores son moléculas clave en la transmisión colinérgica de la placa neuromuscular, en la sinápsis de los ganglios autónomos periféricos y en varias áreas cerebrales como el núcleo interpeduncular, el tálamo, el colículo superior, la habénula medial, la corteza cerebral, la sustancia nigra, el área ventral tegmental, la médula espinal, el colículo inferior, el hipotálamo y el hipocampo (McCormick, 1989; Sargent, 1993; Gotti *et al.*, 1997; Changeux y Edelman, 1998; Lindstrom, 2000).

En la actualidad, se reconoce la existencia de 16 genes que codifican para subunidades del RnACh, las cuales derivan de un ancestro común: α 1 a α 9, β 1 a β 4, γ , ϵ y δ (Le Novère y Changeux, 1995). Estas subunidades han sido clasificadas como α o subunidades de unión a ligando (α 1 a α 9) si contienen una unión disulfuro entre dos residuos de cisteína adyacentes análogos a las Cys¹⁹²-Cys¹⁹³ de la subunidad α 1, o como no- α o subunidades estructurales si no contienen estas cisteínas (β 1 a β 4, γ , ϵ y δ). Estas subunidades tienen varias características estructurales en común: un dominio N-terminal extracelular de gran tamaño, cuatro segmentos transmembranales putativos (M1 a M4), un asa intracelular de tamaño variable que une a los segmentos transmembranales M3 y M4 y juega un papel importante en la regulación del receptor, y una secuencia C-terminal extracelular corta (Figura 1).

Tradicionalmente los RnACh han sido clasificados en dos grupos principales: neuronal y muscular, cada uno con un perfil farmacológico y fisiológico particular. Sin embargo, actualmente se han dividido en tres subfamilias. La primera está constituida por los receptores heteroméricos de músculo esquelético y del órgano eléctrico del pez *Torpedo*, los

cuales tienen una composición $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma 1\delta 1$ en la forma fetal y $(\alpha 1)_2\beta 1\varepsilon 1\delta 1$ en la forma madura. Estos receptores se caracterizan por ser marcados y bloqueados selectivamente por el antagonista α -bungarotoxina. La segunda subfamilia contiene a los receptores heteroméricos neuronales que no unen α -bungarotoxina. Estos receptores neuronales tienen una estructura pentamérica formada por combinaciones de $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\alpha 6$ con subunidades $\beta 2$ o $\beta 4$, y algunas veces con subunidades $\alpha 5$ o $\beta 3$. La tercera subfamilia consta de receptores neuronales homooligoméricos que unen α -bungarotoxina, formados por subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$ o $\alpha 9$. Basados en la homología de la secuencia y en el hecho de que forman homómeros funcionales, se ha sugerido que las subunidades $\alpha 7$ - $\alpha 9$ representan las primeras formas de estos receptores y que las otras subunidades evolucionaron a través de la duplicación de genes y divergencia (Bertrand y Changeux, 1995)

La diversidad de combinaciones posibles entre las subunidades neuronales da como resultado un amplio espectro de RnACh estructural y funcionalmente distintos, con diferentes propiedades farmacológicas y electrofisiológicas (Role, 1992). Tales diferencias han sido demostradas mediante la expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus* y fibroblastos de ratón (Luetje y Patrick, 1991; Whiting *et al.*, 1991).

Los RnACh están presentes en todos los fila de Bilateria, desde nemátodos hasta humanos (Gerschenfeld, 1973; Darlison *et al.*, 1993; Fleming *et al.*, 1993; Leech y Sattelle, 1993).

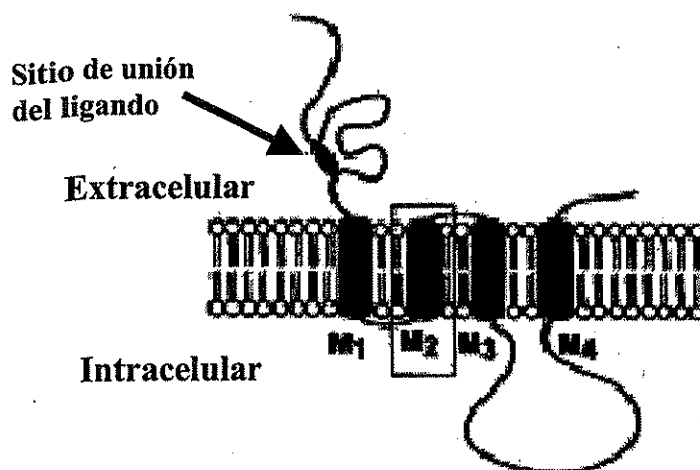


Fig 1. Esquema de una subunidad α del RnACh. Se muestra el dominio extracelular NH_2 -terminal que contiene el sitio de unión de ACh, los cuatro dominios transmembranales (M1-M4), el asa intracelular que une M3 y M4 de longitud variable y el dominio COOH-terminal corto. Contenido en rectángulo se encuentra el segmento transmembranal M2 que se piensa es el responsable de la formación del canal. (Tomado de Paterson y Nordberg, 2000)

ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DEL RnACh.

El grupo de Nigel Unwin ha sido uno de los más interesados en resolver la estructura tridimensional del RnACh. Sus trabajos datan de inicios de los 80's, cuando analizaron mediante microscopía electrónica las membranas postsinápticas del órgano eléctrico de Torpedo (Brisson y Unwin, 1984). Posteriormente, él y otros grupos proporcionaron una forma muy general del RnACh en tres dimensiones, obtenida de imágenes de cristales tubulares de membranas postsinápticas embebidas en hielo. Los datos emanados de esas imágenes proponían que la entrada extracelular del canal, justo en la superficie de la membrana era un tunel perfectamente delineado de 65 Å de profundidad y 20 Å de diámetro (Brisson y Unwin, 1985; Mitra *et al.*, 1989).

Mediante nuevas técnicas, Toyoshima y Unwin (1988, 1990) mostraron más claramente la forma del canal y las relaciones del receptor con otros componentes de la membrana. En su trabajo se revela la existencia de porciones extracelulares del receptor que sobresalen de la bicapa lipídica (anillos concéntricos separados 30 Å), así como la existencia de densidades asociadas a cada receptor que desaparecen cuando el pH de la preparación es elevado a 11.0, proponiendo que se trata de la proteína rapsina (también llamada proteína 43 kDa), que se encuentra normalmente asociada al receptor en estequiometría 1:1 (LaRochelle y Froehner, 1986) y que es liberada a pH alcalino (Neubi *et al.*, 1979).

En 1993, Unwin logró al promediar las transformadas de Fourier de ~50 000 receptores, una resolución de 9 Å, haciendo posible visualizar algunas características de la estructura secundaria. El poro central consiste en una porción que se hunde en la membrana ~65 Å desde la superficie y que está enmarcada por una entrada de ~20 Å. La porción más estrecha del poro está delineada por 5 segmentos de α -hélice, cada uno aportado por cada subunidad. Cada segmento se encuentra en la parte media de la membrana, son la parte mas

cercana al eje del poro y parecen estar involucrados en formar la compuerta. Así mismo, cada subunidad contiene tres conos, los cuales son particularmente relevantes en las dos subunidades α , ya que las cavidades internas delineadas por esos conos en la región colindante con γ y con δ podrían constituir el receptáculo y sitio de unión de la ACh.

Interesados en saber como cambia el receptor cuando se le une ACh, Berriman y Unwin (1994), diseñaron la manera de "capturar" al receptor en el estado abierto. Para ello utilizaron un spray atomizador acoplado al sistema de congelamiento utilizado por ellos anteriormente para obtener cristales. Caracterizaron los cambios estructurales producidos por un amplio rango de concentraciones de ACh. Unwin (1995) describió de manera más profunda los cambios estructurales que subyacen a la apertura del canal, encontrando los cambios más significativos al nivel de los sitios de unión, donde los conos que delimitan la cavidad del sitio de unión en la subunidad α colindante con la subunidad δ (α_δ) giran de manera coordinada, desplazando ligeramente la subunidad α_δ al espacio ocupado previamente por la subunidad β vecina. El giro a nivel de la subunidad α_γ es más discreto y parece tener como función jalar y rotar ligeramente la subunidad β , alejándola de la subunidad α_δ y dándole a ésta última espacio para girar. Todos estos cambios estructurales deben ser concertados, lo que es consistente con el hecho de que se requiere la unión de dos moléculas de ACh para abrir el canal.

Las modificaciones locales en los sitios de unión están asociadas con una pequeña rotación ($<4^\circ$) de todas las subunidades dentro de la membrana. El anillo formado por los sesgos de las cinco α -hélices que delimitan el poro, gira en respuesta a la unión de ACh, de manera tal que los residuos en dicho sesgo normalmente apuntando hacia el eje del poro, rotan hacia los lados, abriendo el poro.

Los hallazgos estructurales de los trabajos de Unwin se correlacionan con los hallazgos obtenidos mediante otras técnicas, como el fotomarcage, la mutagénesis dirigida y la electrofisiología (Villarroel *et al.*, 1991; Lester, 1992; Changeux *et al.*, 1992).

RELACIONES ESTRUCTURA-FUNCION DEL RnACh

Como se mencionó anteriormente, los estudios bioquímicos del receptor de *Torpedo* (Galzi y Changeux, 1995) y de los receptores neuronales (Anand *et al.*, 1991) han establecido que tanto los RnACh musculares como la mayoría de los neuronales, son hetero-oligómeros

compuestos por cinco subunidades transmembranales, los cuales forman una estructura de 'barril' en la membrana, alrededor de un canal iónico central (Cartaud *et al.*, 1973). Los receptores de ACh son complejos glicoproteicos de aproximadamente 290 kDa.

Los RnACh musculares están formados por las subunidades α_1 , β_1 , γ y δ (en la forma adulta) o ϵ (en la forma fetal), en una estequiometría 2:1:1:1. Los receptores neuronales difieren de los musculares en que no contienen subunidades γ , δ o ϵ y que están compuestos por combinaciones de subunidades α_2 - α_9 y β_2 - β_4 .

En la actualidad seis subunidades α (α_2 - α_7) y tres subunidades β (β_2 - β_4) han sido identificadas y clonadas en el cerebro humano (Sargen, 1993; Galzi y Changeux, 1995; McGehee y Role, 1995; Elliott *et al.*, 1996; Gotti *et al.*, 1997). En contraste con los receptores del tipo muscular, las subunidades de los RnACh neuronales se ensamblan de acuerdo a una estequiometría general $2\alpha_3\beta$. Sin embargo se sabe que las subunidades α_7 , α_8 y α_9 forman homo-oligómeros (Couturier *et al.*, 1990).

El análisis de las secuencias de aminoácidos de los RnACh ha revelado una homología significativa entre los subtipos neuronal y muscular. En general, la secuencia del receptor nicotínico consta de: 1) un gran dominio amino-terminal hidrofílico, 2) un dominio hidrofóbico compacto dividido en tres segmentos de 19-27 amino ácidos denominados M1-M3, 3) un pequeño dominio hidrofílico altamente variable y 4) un dominio carboxilo terminal hidrofóbico de aproximadamente 20 aminoácidos denominado M4.

El gran dominio hidrofílico amino terminal está expuesto a la hendidura sináptica, donde juega un papel importante en la unión del ligando, además se sabe que contiene sitios de glucosilación. El pequeño dominio hidrofílico expuesto al citoplasma contiene sitios de fosforilación y los 4 dominios hidrofóbicos (M1-M4) comprenden los segmentos transmembranales del receptor, de los cuales M2 delinea el poro del canal. (Galzi y Changeux, 1995).

SITIOS DE UNION A LIGANDO:

Se conocen un gran número de moléculas farmacológicamente activas que se unen a los RnACh (Tabla I). Los fármacos que actúan en los RnACh pueden agruparse en tres clases: 1) agonistas, 2) antagonistas y 3) ligandos alostéricos, tanto inhibitorios como

excitatorios. Cada uno de estos compuestos ejerce sus efectos a través de la unión a uno o más sitios de unión del receptor.

Sitio de unión a Acetilcolina:

A partir de estudios en el órgano eléctrico de *Torpedo*, se ha puesto de manifiesto que el RnACh cuenta con dos sitios de unión a ACh, cada uno localizado en el gran dominio extracelular N-terminal, en la interfase entre la subunidades α y una subunidad no- α (Reynolds y Karlin, 1978; Lindström *et al.*, 1979). Ambos sitios actúan con cooperatividad positiva, de tal modo que ambos deben ser ocupados por acetilcolina o algún agonista nicotínico para inducir la actividad del canal.

En el RnACh de *Torpedo* y en el tipo muscular se ha observado que los sitios de unión de ACh están formados por residuos de aminoácidos de la interfase de las subunidades α - γ y α - δ , siendo especialmente importantes los residuos de cisteína 192 y 193 (Kao y Karlin, 1986). Cada sitio de unión esta formado por 5 asas separadas. Tres de ellas (A, B, C) se encuentran en la subunidad α , siendo los principales componentes del sitio de unión. Los otros dos asas (D y E) presentes en las subunidades γ y δ , son componentes complementarios (Bertrand y Changeux, 1995).

En los RnACh del tipo neuronal hetero-oligoméricos existen dos sitios de unión a ACh en la interfase entre las subunidades α y β (Alkondon y Albuquerque, 1993). Sin embargo los RnACh de tipo neuronal homo-oligómeros $\alpha 7$, $\alpha 8$ y $\alpha 9$, poseen cinco sitios de unión a ACh idénticos, uno en cada subunidad (Wang *et al.*, 1996; Changeux y Edelstein, 1998).

Sitios de unión alostéricos:

El funcionamiento de los RnACh neuronales está sujeto a modificación por una variedad de compuestos incluyendo fisostigmina, esteroides, etanol y bloqueadores de canales de Ca^{2+} , los cuales no se unen a los sitios de ACh clásicos, sino a una serie de sitios alostéricos estructuralmente distintos, los cuales son insensibles a ACh.

a) Sitios activadores alostéricos no competitivos:

Al igual que los sitios clásicos de unión de ACh, estos sitios alostéricos están localizados en las subunidades α . Los compuestos que se unen a estos sitios son llamados activadores del canal, ya que ellos aumentan la apertura del canal así como la conductancia iónica (Pereira *et al.*, 1993). Dentro de este grupo se encuentran los inhibidores de la colinaesterasa como la fisostigmina, la taurina y la galantamina, así como el relajante muscular benzoquinomium (Svensson y Nordberg, 1996). Existen evidencias que sugieren que la serotonina (5-HT) también se une a estos sitios aumentando la conductancia iónica por medio del aumento de la frecuencia de apertura del canal (Schrattenholz *et al.*, 1996). En células M10 y PC12 estos compuestos pueden activar un sólo canal y esta activación no es afectada por antagonistas nicotínicos competitivos, lo que confirma que actúan en un sitio distinto al de la ACh (Pereira *et al.*, 1994; Storch *et al.*, 1995). Sin embargo, la activación del canal es mínima, lo que sugiere que la función de esta clase de sitios de unión es potenciar la actividad de los RnACh inducida por la unión de ACh en el sitio clásico de unión.

b) Sitios alostéricos negativos no competitivos:

Al contrario de los sitios alostéricos activadores no-competitivos, estos sitios inhiben la función del canal iónico. Existe un amplio número de compuestos que como la clorpromazina, fencyclidina, MK801, algunos anestésicos locales, el etanol y los barbitúricos, que pueden activar este tipo de sitios para producir un efecto negativo en la función del canal sin afectar directamente la unión de la ACh (Lena y Changeux, 1993). Estos bloqueadores no competitivos actúan en dos sitios distintos a aquellos en los que actúan los bloqueadores competitivos. El primer sitio de más alta afinidad, el cual une ligandos en el rango nanomolar, se piensa que está localizado dentro del canal iónico y está formado por aminoácidos presentes en el segmento M2 de cada una de la subunidades que forman el receptor. La unión del ligando a este sitio es facilitada por la activación del receptor por agonista y produce un bloqueo rápido y reversible del canal, bloqueando la conductancia iónica mediante un cambio estérico (Valenzuela *et al.*, 1994). El segundo sitio une el ligando con baja afinidad ($<100 \mu\text{M}$) y se postula está localizado en la interfase entre el receptor y la membrana lipídica. Existen múltiples sitios por cada receptor (10-20) en los cuales la unión del ligando acelera la desensibilización del receptor-canal. En registros de

canal unitario en células PC12 cultivadas expuestas a etanol, se ha observado una reducción del tiempo medio de apertura de los canales y una aceleración de la fase de decaimiento en las corrientes inducidas por ACh (Nagata *et al.*, 1996). En ovocitos de *Xenopus* que expresan $\alpha 7$, el etanol inhibe las corrientes inducidas por ACh sin afectar la afinidad de la ACh por su sitio de unión. El efecto del etanol en otros tipos celulares también ha sido examinado (Gorbounova *et al.*, 1998). El etanol produce una disminución relacionada con la dosis, del número de RnACh, como se ha medido con [3 H]-nicotina en fibroblastos de ratón M10 y con [3 H]-epibatidina en células de neuroblastoma humano SH-SY-5Y. El tratamiento crónico con etanol (100 mM) en células M10 también atenúa parcialmente la regulación positiva de los RnACh producida por el tratamiento con nicotina. En estas mismas células el etanol disminuye significativamente los niveles de RNAm de $\alpha 3$ y aumenta los de $\alpha 4$ y $\alpha 7$, pero no tiene efecto en los niveles de RNAm de $\beta 2$.

Sitios de unión a esteroides:

Los esteroides poseen la habilidad de desensibilizar a los RnACh, mediante la unión a un sitio localizado en el dominio hidrofílico extracelular. Este sitio de unión es distinto al sitio de unión de la ACh (Bertrand *et al.*, 1991; Inoue y Kuriyama, 1991). La progesterona, la corticosterona y la dexametasona son inhibidores potentes de los RnACh ganglionares que contiene $\alpha 3$, expresados en células SH-SY5Y. Estos esteroides ejercen su acción sin afectar la unión de la ACh (Ke y Lucas, 1996). La corticosterona produce desensibilización a la nicotina en los RnACh y su administración crónica en ratones reduce el número de sitios de unión a 125 I- α -bungarotoxina (Grun *et al.*, 1992; Pauly y Collins, 1993; Robinson *et al.*, 1996; Stitzel *et al.*, 1996; Caggiula *et al.*, 1998). También se ha observado que concentraciones de esteroides en el rango μ M desplazan a la 125 I- α -bungarotoxina de su sitio de unión y reducen la afinidad de la nicotina por ese sitio en membranas obtenidas de cerebro de rata (Lena y Changeux, 1993).

Sito de unión a dihidropiridinas:

Algunos antagonistas de canales de Ca^{2+} tipo L como la nimodipina y la nifedipina bloquean la activación inducida por agonistas (Lopez *et al.*, 1993). El mecanismo de acción de estos compuestos no se conoce, pero se propone que el sitio de unión está situado dentro

del canal iónico. Es interesante mencionar que los iones Ca^{2+} pueden modular por sí solos la función del canal en los RnACh. Existen múltiples sitios de unión a Ca^{2+} en los RnACh musculares y neuronales (Fairclough *et al.*, 1993), los cuales al activarse producen una disminución en la conductancia que es sensible al voltaje. Otro tipo de sitio de unión a Ca^{2+} , presente sólo en los receptores neuronales potencia la activación por agonista produciendo una corriente iónica mayor (Mulle *et al.*, 1992).

Otros moduladores alostéricos.

El RnACh es susceptible a modulación por fosforilación. La fosforilación de algunos residuos en el asa citoplásmica por la proteína cinasa A, proteína cinasa C o por cinasas de tirosinas, da como resultado la desensibilización del receptor (Huganir y Greengard, 1990). Una amplia variedad de sustancias que actúan sobre las vías de fosforilación producen la desensibilización del RnACh de manera indirecta. Estos fármacos inducen cambios en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, produciendo la activación de proteínas cinasas sensibles a Ca^{2+} . El neuropéptido CGRP (de las siglas en inglés de calcitonin gene related peptide) y la sustancia P por ejemplo, aumentan la sensibilidad del RnACh a través de la activación de cinasas (Miles *et al.*, 1989; Simmons *et al.*, 1990).

ESTADOS DE TRANSICIÓN DEL RNACH

Los RnACh pueden existir en por lo menos 4 estados conformacionales, los cuales son interconvertibles y funcionalmente distintos. Estos estados pueden ser interpretados en términos del "esquema conformacional" propuesto por Katz y Thesle (1957) que consiste en: 1) un estado de reposo "R", 2) un estado activo "A" donde el canal se abre en una escala de tiempo en el rango de microsegundos a milisegundos. En este estado la afinidad por la ACh es baja (10^{-1} μM), y 3) y 4) uno de los dos estados del canal cerrado-desensibilizado "I" y "D" que son refractarios a la activación en una escala de milisegundos a minutos pero exhiben una alta afinidad por ACh (10^{-8} a 10^{-6} M) y por ligandos nicotínicos (Galzi y Changeux, 1995). La unión de ligandos a la estructura de los RnACh, ya sea en el sitio a ACh o en cualquier sitio alostérico, pueden modificar el equilibrio entre los diferentes estados conformacionales del receptor en cualquier momento dado. Adicionalmente, la unión

de ligandos al RnACh estabiliza diferencialmente el estado conformacional al cual se unen preferencialmente (Lena y Changeux, 1993).

REGULACIÓN POSITIVA DEL RECEPTOR NICOTÍNICO

La exposición prolongada a agonistas da como resultado un incremento en el número de receptores. Este hecho contradice el paradigma generalmente aceptado que sostiene que la sobreexposición a agonistas produce una regulación negativa y la sobreexposición a antagonistas una regulación positiva de los receptores. En varias especies, incluyendo el humano, la exposición duradera a nicotina da como resultado un incremento en el número de RnACh. Estudios postmortem de unión de ligando han revelado un incremento en los sitios de unión a $^3\text{[H]}$ -nicotina y $^3\text{[H]}$ -ACh en los cerebros de fumadores comparados con los de no-fumadores, existiendo una correlación entre el incremento de los sitios de unión y el número de cigarrillos fumados (Benwell *et al.*, 1988; Breese *et al.*, 1997; Nybäck *et al.*, 1989). El número de sitios de unión observados en los cerebros de exfumadores fue aún más bajo que el de los no fumadores. Se ha propuesto que la desensibilización y la regulación positiva de los RnACh que sigue a la exposición crónica de nicotina son la base de la tolerancia a la nicotina mostrada en los fumadores, así como de los síntomas de la abstinencia (Benwell *et al.*, 1988; Balfour y Fagerstrom, 1996, Dani y Heinemann, 1996). En experimentos realizados en ratas, el tratamiento subcrónico con nicotina (0.45 mg/kg, dos veces al día), da como resultado un incremento en el número de sitios de alta afinidad en los RnACh de la corteza, mientras que la proporción de sitios de baja afinidad se reduce. Adicionalmente, existe una reducción significativa de la afinidad de agonistas de ambos tipos de los RnACh (Romanelli *et al.*, 1988).

La rápida desensibilización y la inactivación consecuente después de una exposición crónica a agonistas, da como resultado un déficit en la función colinérgica, el cual es compensado con un incremento en el número de receptores (Schwartz y Kellar, 1985). La regulación positiva, la desensibilización y la inactivación de los RnACh parece depender de la duración de la exposición y de la naturaleza del agonista (Rowell y Duggan, 1998; Reitstetter *et al.*, 1999). La recuperación de la desensibilización de los RnACh musculares, expresados en TE67/RD es significativamente más rápida después de una corta exposición a ACh o a nicotina, con una recuperación a la nicotina más rápida que a la ACh (Reitstetter *et*

al., 1999). Esta observación indica que existe más de un estado de desensibilización del receptor y que los agonistas varían en su habilidad para inducir estos estados. Los diferentes subtipos de RnACh también varían en su sensibilidad a la desensibilización y a la inactivación después de la exposición a los agonistas. Parece que los RnACh $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ son más sensibles a la regulación positiva y a la desensibilización que los otros subtipos. La exposición crónica de ovocitos que expresan $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7$ y $\alpha 3$ humanos a concentraciones submicromolares de nicotina, da como resultado una inactivación irreversible de la mayoría de los receptores $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7$, pero substancialmente menor en el subtipo $\alpha 3$ (Olale *et al.*, 1997). Hsu *et al.* (1996) observaron resultados similares en ovocitos que expresan $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 3\beta 2$. La respuesta funcional de los RnACh $\alpha 4\beta 2$ puede ser completamente abolida después de la incubación por 48 horas con nicotina, mientras que sólo se reduce un 50-60% en $\alpha 3\beta 2$. Adicionalmente, el tiempo medio necesario para recuperar la actividad de $\alpha 3\beta 2$ es de 7.5 horas, mientras que para $\alpha 4\beta 2$ es de 21 horas. Esta observación sugiere que los efectos conductuales de la nicotina se encuentran mediados principalmente por los RnACh $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$.

PATOLOGIAS RELACIONADAS CON LOS RnACh

Papel de los receptores nicotínicos en funciones cognitivas

Existe evidencia de que la nicotina y los agonistas nicotínicos tienen la propiedad de aumentar la memoria en animales y humanos, mientras que los antagonistas empeoran esta función (Levin y Simon, 1998). En roedores y primates no-humanos el tratamiento a largo y corto plazo mejora el desempeño en una variedad de pruebas de memoria. El tratamiento a corto plazo con nicotina mejora el desempeño de la memoria de trabajo en ratas (Levin *et al.*, 1993; Decker, 1995; Decker *et al.*, 1995). Esta mejora también se observa después de la administración de agonistas nicotínicos como lobelina, dimetiletanolamina, ABT-418 y GST-21 (Decker *et al.*, 1993, 1994; Levin *et al.*, 1995). Por el contrario, el antagonista no competitivo mecamylamina, produce un deterioro en el aprendizaje y la memoria. Estos hechos apoyan la teoría de que los RnACh juegan un papel importante en las funciones cognitivas. Esta hipótesis adquiere importancia cuando se considera la pérdida significativa

de RnACh en el hipocampo y la corteza frontal que se observa en la enfermedad de Alzheimer y la pérdida de las funciones cognitivas asociadas a esta. Sin embargo, aún queda por determinar los subtipos de RnACh involucrados en los procesos cognitivos y elucidar las interacciones de estos receptores con otros neurotransmisores críticos en las funciones cognitivas.

Epilepsia

La epilepsia autosomal dominante del lóbulo frontal es un tipo de epilepsia parcial que causa convulsiones breves durante el sueño ligero, pudiendo estar acompañadas de convulsiones violentas generalizadas (Scheffer *et al.*, 1995). Este tipo de epilepsia es el resultado de una mutación en el gen de la subunidad $\alpha 4$, sustituyendo una serina en la posición 247 de M2 por una fenilalanina (Steinlein *et al.*, 1995). Se piensa que esa mutación afecta la función del canal ya que, al expresar la subunidad mutada con una subunidad $\beta 2$ normal en ovocitos de *Xenopus*, se forma un receptor mutante con una permeabilidad reducida a Ca^{2+} , una probabilidad de apertura del canal reducida (debido probablemente a una desensibilización rápida), así como una recuperación lenta del estado desensibilizado (Weiland *et al.*, 1996). La afinidad por ACh en el receptor mutante se encuentra disminuida 7 veces y las corrientes son 5 veces más pequeñas que en el control a concentraciones saturantes de ACh. Adicionalmente estos receptores se desensibilizan a una concentración de agonista 3000 veces más baja que los controles (Bertrand *et al.*, 1998). Otra mutación en la región M2 de $\alpha 4$, en la que se inserta una leucina en la posición 259, causa el mismo tipo de epilepsia (Steinlein *et al.*, 1995). Al igual que en la mutación de la serina 247, la permeabilidad a Ca^{2+} se encuentra reducida. Sin embargo, la epilepsia es el resultado de una activación neuronal excesiva por lo que es contradictorio que mutaciones que reducen la actividad del RnACh causen convulsiones. Una explicación posible es el hecho de que la función presináptica de los receptores $\alpha 4\beta 2$ es promover la liberación de algunos neurotransmisores, incluyendo los inhibitorios GABA y glicina (Wonnacott *et al.*, 1990; Wonnacott, 1997). La facilitación de la liberación de GABA o glicina, o la coactivación de neuronas inhibitorias por receptores $\alpha 4\beta 2$ puede prevenir la instalación de convulsiones entre el sueño y la vigilia por lo tanto, la función reducida de los receptores $\alpha 4\beta 2$ resultante de la mutaciones mencionadas puede desencadenar este tipo de epilepsia.

Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una condición degenerativa progresiva que afecta en los Estados Unidos a 1 de cada 10 personas mayores de 65 años. Es la principal causa de la demencia senil y de la mayoría de los casos de demencia presenil, caracterizándose por un deterioro de las funciones cognitivas superiores, incluyendo la pérdida de la memoria (Octave, 1995). El efecto neurodegenerativo primario de la EA está fuertemente ligado con la producción de amiloide, proteína resultante del procesamiento incorrecto de la proteína precursora de amiloide. A nivel neuroquímico, la anomalía más consistente y severa es la pérdida de inervación colinérgica de la corteza cerebral y del hipocampo (Coyle *et al.*, 1983). En tejido cerebral postmortem de pacientes con EA, los niveles de la enzima acetilcolintransferasa (ChAT), se encuentran significativamente reducidos (Perry *et al.*, 1978). Varios estudios reportan cambios en la densidad de receptores colinérgicos en los cerebros con EA, en comparación con controles de la misma edad (Whitehouse y Au, 1986; Flynn y Mash, 1986; Nordberg y Winblad, 1986; Aubert *et al.*, 1992). Los cambios más significativos han sido observados en las cortezas temporal, parietal y occipital (Nordberg, 1994). Un estudio reciente compara la unión de [³H]-nicotina, [³H]-epibatidina, [³H]-citisina y [³H]-vesamicol (como marcador de los sitios del transportador vesicular), observando una disminución significativa en la corteza temporal de pacientes de EA.

Estudios de unión de ligando en cerebros con EA, indican que los receptores formados por $\alpha 4\beta 2$, constituyen el mayor tipo de receptores perdidos en la EA (Warpman y Nordberg, 1995). Este hecho es apoyado por la observación de que los niveles de RNAm de las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 2$ disminuyen con la edad en la corteza frontal de cerebros humanos y que los niveles de $\beta 2$ se reducen de manera significativa en el hipocampo (Tohgi *et al.*, 1998). En los cerebros de pacientes con EA se ha encontrado una correlación significativa entre la reducción de sitios de unión a [³H]-epibatidina y los niveles reducidos del marcador sináptico sinaptofisina en la corteza frontal, sugiriendo que la mayoría de los RnACh perdidos son presinápticos.

Debido a estos hallazgos, la activación de los RnACh neuronales está siendo investigada como una estrategia para la terapia de la EA (Sjöberg *et al.*, 1998). Esta

estrategia *esta* basada en tres observaciones: 1) la estimulación de los RnACh por nicotina mejora la *función* mnemónica. En roedores, el tratamiento con nicotina mejora el desempeño en pruebas relacionadas con la memoria (Levin, 1992). Los ratones “knockout” de la subunidad $\beta 2$ (ratones que no poseen el gen de dicha subunidad), muestran una conducta anormal en pruebas relacionadas con aprendizaje (Picciotto *et al.*, 1995). En humanos, el antagonista nicotínico mecamilamina afecta la memoria a corto plazo (Newhouse *et al.*, 1992), mientras que la nicotina mejora el desempeño en pruebas relacionadas con la memoria (Colrain *et al.*, 1992; Rustet *et al.*, 1994). También se ha observado que la nicotina produce una mejora en las funciones cognitivas en pacientes con EA (Jones *et al.*, 1992; Valenzuela *et al.*, 1994; Vidal, 1996; Newhouse *et al.*, 1997). 2) La activación de los RnACh modula la liberación de un gran número de neurotransmisores como ACh, DA, GABA y glutamato (Beani *et al.*, 1985; McGenee y Role, 1995; Pontieri *et al.*, 1996; Marshall *et al.*, 1997) 3) Existe evidencia que sugiere que la activación de los RnACh protege a las neuronas de la neurotoxicidad de la proteína β -amiloide. La nicotina protege a células corticales en cultivo de la muerte neuronal inducida por β -amiloide, efecto que es bloqueado por el antagonista selectivo de $\alpha 4\beta 2$, DH β E. Además, la citisina, un agonista selectivo de $\alpha 4\beta 2$ también inhibe la toxicidad del β -amiloide, indicando que el RnACh $\alpha 4\beta 2$ es importante en la neuroprotección (Kihara *et al.*, 1998). Estas observaciones son consistentes con la pérdida del RnACh $\alpha 4\beta 2$ en la EA, lo que podría potenciar la acción neurotóxica de la proteína β -amiloide.

Enfermedad de Parkinson

La Enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa y progresiva, que involucra la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra. Está caracterizada por la dificultad para iniciar y sostener el movimiento fino. Al igual que en la enfermedad de Alzheimer, se presenta una pérdida de células colinérgicas en el cerebro anterior, acompañada por una reducción en el número de sitios de unión de nicotina en el cerebro (Whitehouse *et al.*, 1983; Aubert *et al.*, 1992; Lange *et al.*, 1993). Además de la disfunción motora, los pacientes con EP padecen frecuentemente déficit cognitivo o demencia, asociados a la pérdida de marcadores colinérgicos en especial de RnACh (Perry *et al.*, 1995). La reducción en el número de RnACh corticales en los pacientes de EP es

paralela al grado de demencia y podría ser el resultado (al igual que en la EA) de la degeneración de la proyección colinérgica de las neuronas del mesencéfalo. Esta hipótesis está apoyada por el hecho de que el tratamiento crónico con nicotina en roedores protege de las lesiones nigroestriatales mecánicas o con neurotoxinas, previniendo la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, aumentando los niveles de DA y evitando la regulación positiva de los receptores dopaminérgicos D2 (Janson *et al.*, 1989, 1994; Fuxe *et al.*, 1990; Janson y Moller, 1993). En ratones lesionados con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), la nicotina posee un efecto neuroprotector. La administración aguda de nicotina previa o combinada con el tratamiento con MPTP, reduce la degeneración neuronal en el neostriado y la sustancia nigra (Janson *et al.*, 1988, 1992). Sin embargo, la administración crónica de nicotina, mediante minibombas aumenta la neurotoxicidad del MPTP en el estriado (Janson, 1992). Se piensa que el efecto neuroprotector de la nicotina se debe a la disminución de la recaptura de MPP⁺ (el metabolito neurotóxico del MPTP) en las neuronas dopaminérgicas debido a un incremento en la liberación de DA inducido por la nicotina. A su vez, la potenciación de la neurotoxicidad del MPTP podría ser el resultado de la inhabilidad de los RnACh para desensibilizarse después de la administración crónica de nicotina, produciendo un incremento en el influjo de Na⁺ y Ca²⁺ a través de los RnACh localizados en las neuronas dopaminérgicas, lo que da como resultado la neurotoxicidad por iones Ca²⁺ y un incremento en la demanda energética (Janson *et al.*, 1992)

Esquizofrenia

La esquizofrenia es una condición psicótica crónica que deteriora al individuo que la padece. Comienza en la adolescencia tardía o en la etapa adulta temprana y está caracterizada por alucinaciones, delirios, comportamiento bizarro, apatía y voluntad afectada (Arnold y Trojanowski, 1996; Tsuang, 1993). La etiología de esta condición no se tiene clara, aunque algunos estudios sugieren que la esquizofrenia tiene un fuerte componente genético, con un patrón hereditario complejo que involucra un modo incierto de transmisión, penetración incompleta y heterogeneidad en el genotipo (Rish, 1990; Tsuang, 1993). Se han descrito varios loci para la esquizofrenia en diferentes sitios cromosomales (Pulver *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1995; Silverman *et al.*, 1996). Sin embargo, estos loci no son los mismos para todos los casos de esquizofrenia y no ayudan a delinear cuales aspectos de esta enfermedad

multifactorial están influenciados por locus específicos. Se ha propuesto la hipótesis de la dopamina, que sugiere que la sintomatología es el resultado de un exceso de dopamina, sin embargo, síntomas similares pueden producirse con la administración de drogas como la fenciclidina, un inhibidor de los canales NMDA y de los RnACh. La posible relación de los RnACh con la esquizofrenia se sugirió debido al alto porcentaje de fumadores presentes en la población esquizofrénica comparado con la población general: 90% comparado con 33% (Lohr y Flynn, 1992). Además, el número de sitios de unión a [³H] citisina y [¹²⁵I] BTX en la región CA3 del hipocampo se encuentra significativamente reducido en cerebros postmortem de pacientes esquizofrénicos comparados con cerebros control, indicando un déficit en el número de RnACh en los esquizofrénicos (Freedman *et al.*, 1995). En pacientes esquizofrénicos se ha observado también que poseen niveles elevados de anticuerpos anti-RnACh, los cuales pueden ser un factor que contribuya a la reducción del número de RnACh observado en la esquizofrenia (Mukherjee *et al.*, 1994).

Se ha observado que la nicotina normaliza dos de los mayores déficits psicofisiológicos de los pacientes esquizofrénicos (Adler *et al.*, 1992). Se piensa que una de las mayores deficiencias que subyace a los síntomas de la esquizofrenia como las alucinaciones y los delirios es una deficiencia en la regulación de la respuesta a estímulos sensoriales. La atención a estímulos externos del entorno es generalmente ignorada por sujetos normales, no así en sujetos esquizofrénicos, por lo que se sugiere que los mecanismos neuronales responsables de "filtrar" la entrada del estímulo sensorial están deteriorados. Por ejemplo, en sujetos normales, la respuesta a un estímulo auditivo inicial produce una respuesta excitatoria que a su vez activa mecanismos inhibitorios, los cuales entonces disminuyen la respuesta excitatoria que sigue a un segundo estímulo o estímulo pareado. En los pacientes esquizofrénicos y sus familiares, la habilidad para disminuir la respuesta excitatoria producida por el segundo estímulo auditivo está disminuida comparada con los sujetos normales y se normaliza transitoriamente después de la administración de nicotina o de fumar un cigarro (Adler *et al.*, 1985, 1992, 1993). Este defecto neuronal ha sido vinculado a un polimorfismo en el cromosoma 15 en el cual se encuentra el locus del RnACh $\alpha 7$ (Chini *et al.*, 1994; Freedman *et al.*, 1997). El receptor $\alpha 7$ está además implicado en la esquizofrenia por la observación de que la expresión de esta subunidad está

significativamente reducida en la corteza frontal de cerebros de pacientes esquizofrénicos comparados con los controles de la misma edad (Guan *et al.*, 1999).

Síndrome de Tourette

El síndrome Gilles de la Tourette (ST) es un desorden neurosiquiátrico de etiología desconocida que comienza en la infancia y se caracteriza por "tics" verbales y motores persistentes, así como por episodios frecuentes de hiperactividad, ansiedad, fobias y desordenes obsesivo-compulsivos. Para tratar este desorden se han utilizado neurolépticos clásicos tales como el haloperidol, pero no siempre son efectivos y producen efectos colaterales como sedación y discinesia. Varios estudios han reportado que la administración de nicotina mediante goma de mascar o parches transdermales potencia la acción de los neurolépticos y es efectiva para aminorar los síntomas del ST (Sanberg *et al.*, 1988; McConville *et al.*, 1992; Dursun y Reveley, 1997; Sanberg *et al.*, 1997). Se ha observado una mejora hasta por 4 semanas en pacientes de ST tratados sólo durante dos días con parches de 10 mg de nicotina (Dursun y Reveley, 1997). El mecanismo a través del cual la nicotina disminuye los síntomas de esta enfermedad aún no se conocen, pero muy posiblemente involucra la modulación de la liberación de dopamina. La exposición prolongada a nicotina produce la desensibilización reversible de los RnACh y algunas veces puede causar la inactivación permanente de estos receptores, especialmente de los subtipos $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ (Hsu *et al.*, 1996; Olale *et al.*, 1997). La inactivación permanente de estos receptores, seguida por una re-síntesis lenta, podría explicar los beneficios que duran semanas después de la administración de nicotina. De este modo, resulta deseable desarrollar agonistas nicotínicos que actúen sin los efectos colaterales de la nicotina como alternativa en el tratamiento del ST.

Ansiedad y depresión

Los RnACh están aparentemente involucrados en la fisiopatología de la ansiedad y la depresión. Se ha observado que la administración de nicotina posee efectos ansiolíticos en humanos y en modelos animales de ansiedad (Pomerleau, 1986; Decker *et al.*, 1994). Este efecto es bloqueado por la administración del agonista no competitivo mecamilamina y por flumazenil, un agonista parecido a la benzodiazepina. Estas observaciones sugieren que la

acción ansiolítica de la nicotina es producida por un aumento en la liberación de GABA, el cual entonces actúa en el receptor GABA_A sensible a benzodiazepinas. Los estudios clínicos han demostrado una relación directa entre fumar y la depresión mayor: las personas con depresión mayor son en su mayoría fumadores con una gran dificultad para controlar el hábito y tienen alto riesgo de padecer de depresión media o mayor cuando intentan dejar dicho hábito (Glassman *et al.*, 1988, 1990; Breslau *et al.*, 1993; Dalack *et al.*, 1995; Stage *et al.*, 1996; Covey *et al.*, 1997, 1998). Estos datos de predisposición involucran factores genéticos o ambientales, sin embargo otros mecanismos causales pueden influir, como la automedicación y el efecto neurofarmacológico que la nicotina u otras sustancias tiene sobre los neurotransmisores involucrados en la depresión. (Breslau *et al.*, 1998). La depresión aumenta el gusto por fumar, así como por la nicotina y otras sustancias que generan dependencia. Los parches transdermales de nicotina mejoran el ánimo de los pacientes deprimidos no fumadores y aumenta la duración del sueño REM (Salin-Pascual *et al.*, 1996; Salin-Pascual y Drucker-Colin, 1998). También se ha observado que la nicotina actúa como antidepresivo en modelos animales de depresión (Semba *et al.*, 1998). Existe cada vez mas evidencia que une a los RnACh con los antidepresivos tricíclicos clásicos (imipramina, desipramina) y con los inhibidores de la recaptura de serotonina (fluoxetina, paroxetina). Los antidepresivos tricíclicos imipramina, desipramina, amitriptilina y nortriptilina producen una inhibición no competitiva en los RnACh, inhibiendo reversiblemente las corrientes inducidas por agonistas (Schofield *et al.*, 1981; Arita *et al.*, 1987; Rana *et al.*, 1993). Los inhibidores de la recaptura de serotonina tales como fluoxetina, peroxetina, sertelina, venlafaxina y nefazodone también producen una inhibición no-competitiva, reversible de los RnACh (Fairclough *et al.*, 1993; Dalack *et al.*, 1995; García-Colunga *et al.*, 1997; Hennings *et al.*, 1997; Maggio *et al.*, 1998; Fryer y Lukas, 1999). El Prozac (fluoxetina) bloquea las corrientes del RnACh de manera dependiente de voltaje e incrementa la proporción de desensibilización del receptor (García-Colunga *et al.*, 1997; Maggio *et al.*, 1998). En rebanadas de hipocampo de rata, la fluoxetina inhibe la liberación de noradrenalina inducida por nicotina, de una manera dependiente de la dosis (Hennings *et al.*, 1997). A pesar de la conexión entre la depresión, los antidepresivos y la nicotina, el papel de los RnACh como blanco para el tratamiento de la depresión no ha sido todavía explotado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Miastenia gravis

La *Miastenia gravis* es una enfermedad poco frecuente causada por una reacción autoinmune dirigida contra los RnACh musculares. Algunos síndromes miasténicos congénitos están asociados con mutaciones puntuales en las subunidades musculares $\alpha 1$, $\beta 1$ o ϵ . Algunas de esas mutaciones afectan los estados de transición de apertura ($\epsilon P121L$, $\epsilon 1254ins18$), o afectan el ensamblaje de los RnACh ($\epsilon R147L$) causando síntomas de miastenia sólo cuando se combinan con mutaciones nulas del otro alelo (Ohno *et al.*, 1996, 1997; Milone *et al.*, 1998). Las mutaciones nulas se acompañan de síntomas sólo cuando están presentes en ambos alelos (Engel *et al.*, 1996). En modelos animales “knock-out” de la subunidad ϵ , sólo se expresan síntomas de la enfermedad en el genotipo homocigoto (Witzemann *et al.*, 1996). En estos pacientes de miastenia y en los modelos animales, la neurotransmisión es parcialmente rescatada en la placa neuromuscular por la persistencia de la expresión de la subunidad fetal γ .

Otro tipo de mutaciones que producen síndromes miasténicos aún en el fenotipo heterocigoto, son aquellas que aumentan el tiempo de apertura de los RnACh (Ohno *et al.*, 1995; Sine *et al.*, 1995; Engel *et al.*, 1996; Gomez *et al.*, 1996; Croxen *et al.*, 1997; Milone *et al.*, 1997). Estas mutaciones que causan un incremento en la función se encuentran generalmente en la región de unión del ligando ($\alpha 1G153S$, $\alpha 1V156M$), en el segmento M2 que delinea el poro del canal ($\alpha 1T254I$, $\alpha 1V249F$, $\beta 1V266M$, $\beta 1L262M$, $\epsilon L269F$) o en regiones adyacentes ($\alpha 1N217K$, $\alpha 1S269I$, $\epsilon P245L$). Estas mutaciones pueden afectar tanto las propiedades intrínsecas de unión de ligando, como los estados transicionales de apertura y desensibilización (Edelstein *et al.*, 1997a, b; Galzi *et al.*, 1996). La confirmación de que las mutaciones que aumentan la función del RnACh muscular ha sido obtenida en un modelo animal de ratones transgénicos que portan la mutación $\epsilon L269F$ (Gomez *et al.*, 1997).

HIPÓTESIS

1. Los receptores-canal de la familia del RnACh, poseen secuencias conservadas en el asa citoplásmica, a pesar de la variabilidad de esta región entre los miembros de la familia.
2. Dichas secuencias forman dominios estructurales y/o funcionales.
3. Al igual que otros dominios existentes en la naturaleza, los posibles dominios presentes en el asa citoplásmica de los receptores de la familia de los RnACh, se encuentran presentes en más de una familia de proteínas.

OBJETIVOS GENERALES

1. Identificar la presencia de secuencias conservadas en la secuencia primaria del asa citoplásmica que une los segmentos transmembranales M3 y M4 en los receptores de la familia del RnACh.
2. Investigar la existencia de secuencias similares a las encontradas en el asa citoplásmica de los receptores de la familia del RnACh en el banco de datos de proteínas.
3. Investigar la posible existencia de dominios estructurales en el asa citoplásmica de los receptores de la familia del RnACh.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar estructural y funcionalmente el motivo encontrado en el asa citoplásmica de los receptores de la familia del RnACh.
2. Establecer correlaciones estructurales y/o funcionales de dicho motivo con otras secuencias de proteínas cristalizadas.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

METODOLOGÍA

1. Se ingresaron a una base de datos las secuencias primarias del asa citoplásmica de diferentes receptores canal. La longitud de dichas secuencias estaba en un intervalo entre 100-160 aminoácidos. Las secuencias analizadas correspondieron a 40 subunidades del RnACh, incluyendo subunidades del tipo neuronal y muscular, 11 subunidades del receptor a GABA_A y 4 subunidades del receptor de glicina. Como control, se incluyeron las secuencias de 4 receptores de glutamato (2 tipo NMDA y 2 no-NMDA), un canal de potasio, un receptor dopaminérgico, dos transcriptasas reversas y una proteína con dominio SH₂.
2. Por medio del programa MOTIF (Smith *et al.*, 1990) se analizaron las secuencias en busca de un patrón común de aminoácidos.
3. Los segmentos de secuencia en los que se encontró el motivo fueron analizados con los programas de predicción de estructura secundaria Chou-Fasman y Mpredict.
4. Una vez identificada la existencia de un motivo, se realizó una búsqueda más amplia en los bancos de datos SWISS-PROT y TREMBL.
5. Con el objeto de realizar estudios estructurales en el motivo encontrado, se diseñaron péptidos sintéticos obtenidos mediante la síntesis de proteínas de fusión con la proteína Glutation-S-Transferasa (GST). Se diseñó la secuencia de DNA con codones preferentes para *E. coli*, de la región correspondiente al motivo de dos de las proteínas en las que se encontró (subunidad α del RnACh muscular de ratón y catalasa de hígado bovino). Dicha secuencia constituyó el motivo, 23 residuos hacia el amino terminal y 15 hacia el carboxilo, lo que dió como resultado una secuencia de DNA de 177 bases que codifica para un péptido de 59 residuos. Para cada secuencia se diseñaron y se sintetizaron en el Instituto de Biotecnología, 10 oligonucleotidos, los cuales sirvieron de templado para obtener el fregmento deseado mediante PCR recursivo. Una vez obtenidos los fragmentos deseados, estos se clonaron en el plásmido pGEX-3X utilizando las enzimas de restricción EcoR1 y BamH1. La expresión de este vector dió como resultado la proteína de fusión GST-motivo.

6. Se establecieron las condiciones de inducción para expresar la proteína (0.1 μ M Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG), 2 hr, 30°C). El cultivo celular fue sonificado y la proteína de fusión fue purificada mediante una columna de agarosa-glutatin, eluyendo con 10 mM glutatión reducido. Se corroboró mediante geles de acrilamida la presencia del péptido en la fracción eluida y se cuantificó por medio de espectrofotometría (1 U_{A280} = 0.5 mg/ml).
7. Basados en la secuencia de las subunidades $\alpha 2$ y $\beta 4$ de rata, se diseñaron oligonucleótidos para eliminar mediante PCR, la secuencia que codifica los 6 aminoácidos iniciales del motivo encontrado (RXPXTHX₁₄P), así como la P final, o para todo el motivo, en cada subunidad.
8. La presencia de las deleciones de interés fue corroborada mediante secuenciación manual con ³²P.
9. Mediante transcripción *in vitro*, se obtuvieron los RNA mensajeros de las subunidades mutadas, los cuales fueron inyectados en ovocitos de *Xenopus*, para su caracterización electrofisiológica.
10. La expresión de los receptores mutantes se evaluó 4 días después de la inyección de los mensajeros. Se realizaron registros de fijación de voltaje con dos electrodos, en donde se investigó la cinética de la corriente añadiendo a la perfusión agonistas colinérgicos en diversas condiciones experimentales.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

Comparación de secuencias

En la parte inicial de este proyecto se analizaron las secuencias del asa citoplásmica que une las regiones M3 y M4 en los receptores de la familia del RnACh, en búsqueda de secuencias conservadas o motivos. Este análisis incluyó subunidades del RnACh, del receptor de GABA_A y del receptor de glicina, así como de receptores glutamatérgicos como control. El programa MOTIF (Smith *et al.*, 1990) localizó sólo en el asa citoplásmica de los RnACh un motivo formado por 5 aminoácidos en un bloque de 21: RXPXTH(X)₁₄P.

Una vez identificado el motivo RXPXTH(X)₁₄P, se realizó una búsqueda en el banco de datos SWISS-PROT y TREMBL que dió como resultado la presencia del motivo en 82 subunidades del RnACh, incluyendo subunidades de los receptores musculares y neuronales; en 20 catalasas, enzimas no relacionadas con la familia del RnACh y en 9 proteínas variadas, entre las que se encuentran la proteína ribosomal L9 y el factor de transcripción PAX8. En total el motivo RXPXTH(X)₁₄P se localizó en 111 proteínas (Tabla 1)

En las subunidades del RnACh el motivo RXPXTH(X)₁₄P se encuentra en la zona amino del asa citoplásmica mayor, a sólo tres residuos del segmento transmembranal M3 y antes de las secuencias consenso de fosforilación. Dependiendo de la especie y del tipo de receptor (muscular o neuronal), el motivo inicia en los residuos 285-355 y finaliza en los residuos 305-375.

En el caso de las catalasas, el motivo se localizó entre los aminoácidos 131-190 dependiendo la especie. Entre las 20 catalasas en las que se encontró el motivo no se encuentra ninguna catalasa vegetal.

Dentro de las catalasas que presentan el motivo, se encuentra la catalasa hepática de bovino, la cual ha sido cristalizada y su estructura tridimensional resuelta por difracción de rayos X (Murthy *et al.*, 1981), por lo que se utilizó en el presente proyecto como referencia para proponer una posible estructura general para el motivo RXPXTH(X)₁₄P.

La catalasa hepática de bovino es un tetrámero (57 kD por monómero) con una porfirina IX como grupo prostético, cuya estructura tridimensional ha sido resuelta con una resolución de 0.25 nm. En la estructura terciaria de cada monómero se distinguen cuatro dominios. El motivo RXPXTH(X)₁₄P se localiza en la parte media del segundo dominio, en las zonas comprendidas entre las hélices α 3 y 5. Los primeros cuatro aminoácidos del

motivo (RXPXTH), que son de naturaleza hidrofílica, se encuentran en una zona de sesgo entre las α -hélices 3 y 4 (Fig. 2). De acuerdo a Murthy *et al.* (1981), esta región de la catalasa participa en el contacto proteína-proteína entre monómeros. Las α -hélices 4 y 5 tienden a presentar aminoácidos hidrofóbicos en sus estructuras, aunque se reconocen algunos aminoácidos cargados en las posiciones 8, 9 y 15 del segmento que presenta el motivo. La P que se encuentra en la parte carboxilo del motivo provoca un cambio en la dirección de la cadena peptídica de la catalasa entre la α -hélice 4 y la α -hélice 5. La α -hélice 3 hace contacto con el grupo prostético de la enzima, el cual se localiza 2 nm bajo la superficie de la proteína. Esta α -hélice forma parte de un canal hidrofóbico por el cual el H_2O_2 alcanza el sitio activo de la enzima.

A manera de resumen, el motivo RXPXTH(X)₁₄P en la catalasa está localizado uniendo un conjunto de 3 α -hélices, la parte amino terminal está involucrada en el contacto entre subunidades y la P final del motivo, en el carboxilo terminal, permite cambios en la dirección de la cadena peptídica.

Basados en la información que aporta el cristal de la catalasa hepática de bovino, en el presente proyecto sugerimos que el motivo RXPXTH(X)₁₄P posee características estructurales similares en la catalasa y en los RnACh. Debido a que no se cuenta con información de la estructura tridimensional a alta resolución de los RnACh, el análisis que a continuación se expone, se basa en conceptos vigentes sobre topografía intramembranal de los RnACh, algoritmos de predicción de estructura secundaria y en el análisis detallado de la estructura primaria de los segmentos que contienen el motivo RXPXTH(X)₁₄P.

Como se mencionó anteriormente, en los RnACh la primera región del motivo RXPXTH(X)₁₄P se localiza a 3 residuos de la región transmembranal M3. Con la información de la que disponemos, podemos sugerir que la región M3 del RnACh es equivalente al α -hélice 3 de la catalasa hepática bovina, ya que ambas regiones presentan naturaleza hidrofóbica: el segmento M3 se encuentra inmerso en la membrana y el α -hélice 3 forma parte del canal hidrofóbico que conduce el H_2O_2 al sitio activo de la enzima.

Diversos algoritmos de predicción de estructura secundaria aplicados en las secuencias de los RnACh, califican los primeros 8-10 aminoácidos de la sección amino del motivo RXPXTH(X)₁₄P mayoritariamente como sesgo (giro β). Esta sección es rica en aminoácidos polares y es donde se ubican los primeros 4 aminoácidos del motivo, es decir la

R, P, T y H. Los aminoácidos posteriores a esta región tienden a ser de naturaleza hidrofóbica y, según los algoritmos de predicción de estructura secundaria, adoptan una conformación predominantemente α -helicoidal. Es en la mitad de esta parte estructurada donde se encuentra la segunda P del motivo. Todas estas características coinciden con la disposición espacial del motivo en la catalasa hepática bovina en donde existe un arreglo similar de aminoácidos polares e hidrofóbicos en los extremos amino y carboxilo respectivamente. El segmento polar con estructura de sesgo de la sección amino del motivo RXPXTH(X)₁₄P en los RnACh podría ser equivalente al segmento de la catalasa hepática bovina que conecta las hélices α 3 y 4. Después de este segmento se encuentra una parte calificada como α -hélice, la cual estaría formando el equivalente a las α -hélices 4 y 5 del cristal de la catalasa. Estas similitudes entre el motivo de la catalasa hepática bovina y las subunidades del RnACh permiten formular la hipótesis de que la segunda P del motivo estaría desempeñando un papel semejante en ambas proteínas, cambiando la dirección de la cadena polipeptídica y marcando una discontinuidad en la parte helicoidal antes mencionada.

Dentro del bloque de 21 residuos que forman el motivo en las 82 subunidades del RnACh, existen algunos hallazgos que resultan interesantes. La posición 8 presenta una M conservada en las subunidades α y β (excepto en *C. elegans*) de todos los RnACh musculares y neuronales (63 subunidades). Entre las subunidades γ , sólo la del pez Torpedo (*T. californica*) no presenta dicha M. En el caso de las subunidades δ , la M estuvo ausente en todas ellas, excepto en la de pollo. De manera interesante, la posición 8 del motivo RXPXTH(X)₁₄P es también constante en las 20 catalasas que figuran en la Tabla 1, estando siempre ocupada por un aminoácido básico (R en 5 catalasas, K en 14 y H en 1).

La posición 11 del bloque presenta un W en 61 de las 82 subunidades del RnACh contenidas en la Tabla 1, con excepción de una subunidad, la δ del RnACh de pollo, las subunidades que presentan el W son α y β de los RnACh musculares y neuronales. Solamente 2 subunidades β no conservaron este patrón, ambas de la mosca de la fruta (*D. melanogaster*).

La posición 13 del bloque que forma el motivo es particularmente interesante, ya que todas las subunidades de los RnACh musculares y neuronales, excepto las subunidades α de

D. melanogaster (Q) y de *M. persicae* (V), presentan un aminoácido básico (49 R, 30 K y 1 H).

La posición 16 del bloque presenta una F en 72 de las 82 subunidades de los RnACh contenidos en la Tabla 1. La subunidad α muscular de *C. elegans*, las subunidades γ de pollo y de *Xenopus*, todas las subunidades ϵ consideradas y las subunidades $\alpha 2$ neuronales de *H. sapiens* y de *R. norvegicus*, no la presentan. Sin embargo, es importante notar que la F de la posición 19 está absolutamente conservada en las 20 catalasas que presentaron el motivo.

Se ha observado que la sección de los RnACh en donde se ubica el motivo RXPXTH(X)₁₄P es importante para el ensamblaje de la estructura pentamérica que caracteriza a esta clase de receptores-canal (Yu y Hall, 1994). Esta observación coincide con el papel asignado, en la catalasa hepática bovina, a los primeros aminoácidos del motivo, en donde también se ha mostrado se lleva a cabo el contacto proteína-proteína entre los monómeros de la enzima.

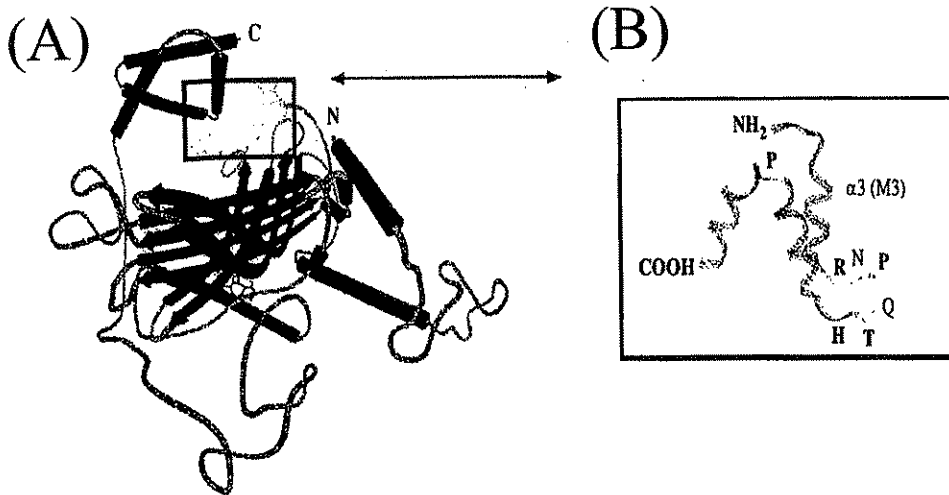


Fig 2. Representación tridimensional del motivo en la catalasa hepática de bovino. a) Representación de un monómero de la catalasa, en el recuadro se muestran las α -hélices que contienen el motivo $RXPXTH(X)_{14}P$. (b) Segmento de la catalasa cristalizada en el que se muestran las α -hélices que contienen el motivo. Los primeros cuatro aminoácidos del motivo están localizados en la unión entre las α -hélices 3 y 4; el quinto aminoácido genera un sesgo que divide las α -hélices 4 y 5.

Tabla 1. Alineamiento de secuencias. Se muestran las secuencias de las subunidades del RnACh, las catalasas y otras proteínas en las que se encontró el motivo $RXPXTH(X)_{14}P$. Las subunidades del RnACh están enlistadas dependiendo el tipo, muscular o neuronal. Se ha incluido además la especie a la que pertenece cada secuencia así como la posición del motivo.

Subunidades de Tipo muscular del RnACh.

1. Tipo α C. <i>Elegans</i>	319	RTPETHDMGPWTRNLLLYWIP	339
2. Cadena tipo α 1 D. <i>Melanogaster</i>	330	RSPVTHRMAPWVQRLFQILP	350
3. Tipo α M. sexta	330	RSPQHTMSPWVRRVFIHVLP	350
4. cadena α -L1 <i>S. gregaria</i>	332	RKPSTHKMAPWVRKVFIRRLP	352
5. cadena α -1A <i>X. leavis</i>	321	RSPSTHIMPQWLKKIFIEIETIP	341
6. α 2 D. <i>melanogaster</i>	351	RKPSTHKMRPWIRSFIFIKRLP	371

7. α -1B <i>X. leavis</i>	321	RSPSTHTMPPWVRKIFLETIP	341
8. Tipo α UNC-38 <i>C. elegans</i>	347	RTPTTHLMPNWWKKVFLKWLP	367
9. α cadena <i>B. taurus</i>	321	RSPSTHVMPPEWVRKVFIDTIP	341
10. α cadena <i>G. gallus</i>	320	RSPSTHTMPPWVRKIFIDTIP	340
11. α cadena <i>H. sapiens</i>	346	RSPSTHVMPNWWVRKVFIDTIP	366
12. α cadena <i>M. musculus</i>	321	RSPSTHIMPEWVRKVFIDTIP	341
13. α cadena <i>R. norvegicus</i>	321	RSPSTHIMPEWVRKVFIDTIP	341
14. α cadena <i>T. californica</i>	325	RSPSTHTMPQWVRKIFIDTIP	345
15. α cadena <i>T. marmorata</i>	325	RSPSTHTMPQWVRKIFINTIP	345
16. α subunidad <i>M. persicae</i>	334	RSPVTHKMRPWVVKLFIQILP	354
17. α subunidad <i>H. contortus</i>	343	RTPTTHLMPKWVFLVFLKWLP	363
18. Lig-bind sub <i>O. circumcincta</i>	129	RTPTTHLMPKWVFLVFLKWLP	149
19. α subunidad <i>B. rerio</i>	321	RSPSTHIMPAWVRKIFIDTIP	341
20. α subunidad <i>H. viriscens</i>	336	RSPQTHMAPWVRRVFIHVLP	356
21. α subunidad <i>A. suum</i>	259	RTPTTHRMPEWVKWFLKFLP	279
22. Tipo β <i>C. elegans</i>	320	RGPRTHRMPPQWVRVFLQFLP	340
23. cadena1 Tipo β <i>D. melanogaster</i>	326	RGPRTHRMPPMYIRSIFLHYLP	346
24. cadena2 Tipo β <i>D. melanogaster</i>	316	RSPSTHNSRLVLRKFLHFMP	336
25. Tipo β ACR-3 <i>C. Elegans</i>	317	RGPATHIMPNWVKTVFLKFLP	337
26. Tipo β LEV-1 <i>C. elegans</i>	328	RSPITHRLPPWVRKVFILDILP	348
27. cadena β <i>B. taurus</i>	336	RSPHTHQMPLWVRQIFIHKLP	356
28. cadena β <i>H. sapiens</i>	335	RSPSTHQMPLWVRQIFIHKLP	355
29. cadena β <i>M. musculus</i>	335	RSPHTHQMPFWVRQIFIHKLP	355
30. cadena β <i>R. norvegicus</i>	335	RSPHTHQMPFWVRQIFIHKLP	355
31. cadena β <i>T. californica</i>	331	RSPNTHTMPNWIWVRQIFITLP	351
32. cadena β <i>X. leavis</i>	326	RSPNTHHMPQWVKQIFIHLYLP	346
33. cadena β <i>L. migratoria</i>	300	RGPRTHRMPPWIRAVFLYYLP	320
34. cadena β <i>H. viriscens</i>	323	RGPRTHRMPLWIRSVFLHYLP	343
35. cadena β <i>M. sexta</i>	164	RGPRTHRMPLWIRSVFLHYLP	184
36. cadena γ <i>B. taurus</i>	332	RSPHTHSMARGVRKVFRLLLP	352
37. cadena γ <i>G. gallus</i>	333	RTPNTHSMSQRVRQVWLHLLP	353
38. cadena γ <i>H. sapiens</i>	332	RSPHTHSMARGVRKVFRLLLP	352

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

39. cadena γ <i>M. musculus</i>	332 RSPHTHSMARGVRKLFRLLLP	352
40. cadena γ <i>R. norvegicus</i>	332 RSPHTHSMARGVRKVFLRLLLP	352
41. cadena γ <i>T. californica</i>	327 RTPNTHSLSEKIKHLFLGFLP	347
42. cadena γ <i>X. leavis</i>	326 RTPNTHSMSSTVRELCLRTVP	346
43. cadena δ <i>B. taurus</i>	335 RTPSTHVLSEPVKKLFLETLP	355
44. cadena δ <i>G. gallus</i>	335 RTPSTHVMSDWVRGVFLEILP	355
45. cadena δ <i>H. sapiens</i>	336 RTPSTHVLSEGVKKLFLETLP	356
46. cadena δ <i>M. musculus</i>	339 RTPSTHVLSEGVKKFFLETLP	359
47. cadena δ <i>R. norvegicus</i>	339 RTPSTHVLSEGVKKFFLETLP	359
48. cadena δ <i>T. californica</i>	336 RTPSTHVLSTRVKQIFLEKLP	356
49. cadena δ <i>X. leavis</i>	338 RTPSTHAISERMKEIFLNKLP	358
50. cadena ϵ <i>B. taurus</i>	331 RTPTTHAMSPRLRYVLELLP	351
51. cadena ϵ <i>H. sapiens</i>	331 RTPTTHAMSPRLRHVLELLP	351
52. cadena ϵ <i>M. musculus</i>	331 RTPTTATHSPRLRQILLELLP	351
53. cadena ϵ <i>R. norvegicus</i>	331 RTPTTATHSPRLRQILLELLP	351
54. cadena ϵ <i>X. leavis</i>	326 RTPNTHSMSSTVRELCLRYVP	346

Subunidades del Tipo Neuronal del RnACh

55. cadena $\alpha 2$ <i>G. gallus</i>	330 RSPSTHTMPHWVRSFFLGFIP	350
56. cadena $\alpha 2$ <i>H. sapiens</i>	355 RSPSTHTMPHWVRGALLGCVP	375
57. cadena $\alpha 2$ <i>R. norvegicus</i>	332 RSPSTHNMPNWRVALLGRVP	342
58. cadena $\alpha 2$ <i>L. migratoria</i>	309 RSPSTHRMSPWVKRVFLHFMP	329
59. cadena $\alpha 2$ <i>H. viriscens</i>	326 RKPSTHKMAPWVRKFFITKLP	346
60. cadena $\alpha 3$ <i>B. taurus</i>	321 RTPTTHTMPAWVKTIIFLNLLP	341
61. cadena $\alpha 3$ <i>C. Auratus</i>	323 RTPMHTMPSWVRTVFLRALP	343
62. cadena $\alpha 3$ <i>G. gallus</i>	322 RTPKTHTMPVWVRTIIFLNLLP	342
63. cadena $\alpha 3$ <i>H. sapiens</i>	329 RTPTTHTMPSWVKTVFLNLLP	349
64. cadena $\alpha 3$ <i>R. norvegicus</i>	325 RTPTTHTMPTWVKAVFLNLLP	345
65. cadena $\alpha 3$ <i>D. melanogaster</i>	331 RSPQTHTMAPWVRTVFINQLP	351
66. cadena $\alpha 3$ <i>L. migratoria</i>	298 RSPVTHMRPWVHRLFIOQLP	318
67. cadena $\alpha 3$ <i>H. viriscens</i>	333 RSPSTHTMSPWMKKLFLQLMP	353
68. cadena $\alpha 4$ <i>G. gallus</i>	328 RSPRTHTMPDWVRRVFLDIVP	348

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

69. cadena $\alpha 4$ <i>H. sapiens</i>	333 RSPRTHTMPWVRRVFLDIVP	353
70. cadena $\alpha 4$ <i>R. norvegicus</i>	339 RSPRTHMPAWVRRVFLDIVP	359
71. cadena $\alpha 6$ <i>G. gallus</i>	330 RTPTHTMPKWVKTVFLSLLP	350
72. cadena $\alpha 6$ <i>H. sapiens</i>	330 RTPTHTMPRWVKTVFLKLLP	350
73. cadena $\alpha 6$ <i>R. norvegicus</i>	330 RTPATHTMPKWVKTMFLQVFP	350
74. Tar-1 <i>T. colubriformis</i>	304 RTPTHLMPKWVKLVFLKWLP	324
75. cadena $\beta 2$ <i>C. auratus</i>	294 RSPSTHYMPEWVKCVFLHKLP	314
76. cadena $\beta 2$ <i>G. gallus</i>	317 RSPTTHTMPWPVRTLFLRKLP	337
77. cadena $\beta 2$ <i>H. sapiens</i>	324 RSPTTHMAPWVKVFLKLP	344
78. cadena $\beta 2$ <i>R. norvegicus</i>	327 RSPTTHMAPWVKVFLKLP	347
79. cadena $\beta 4$ <i>G. gallus</i>	302 RSPSTHTMPPWVKLVFLERLP	322
80. cadena $\beta 4$ <i>H. sapiens</i>	322 RSPSTHTMAPWVKRCFLHKLP	342
81. cadena $\beta 4$ <i>R. norvegicus</i>	321 RSPSTHTMASWVKECFLHKLP	341
82. cadena no- α <i>O. volvulus</i>	285 RRPSTHRMPIWVKWLFRLILP	305

Catalasas

83. Catalasa <i>B. taurus</i>	169 RNPQTHLKDPDMVWDFWLSLRP	189
84. Catalasa <i>B. abortus</i>	148 RHPRTHLRSATAMWDFWLSLSP	168
85. Catalasa <i>D. melanogaster</i>	168 RNPQTHLKDPDMFDFLTLRP	188
86. Catalasa <i>H. sapiens</i>	170 RNPQTHLKDPDMVWDFWLSLRP	190
87. Catalasa <i>M. musculus</i>	170 RNPQTHLKDPDMVWDFWLSLRP	190
88. Catalasa <i>R. norvegicus</i>	170 RNPQTHLKDPDMVWDFWLSLCP	190
89. Catalasa <i>L. sake</i>	148 RDPRTHARSQDMQWDFWLSLSP	168
90. Catalasa <i>B. subtilis</i>	148 RDPKTHLKNPTAVWDFWLSLSP	168
91. Catalasa <i>C. elegans</i>	166 RNPQTHLKDPNMI FDFWLHRP	186
92. Catalasa <i>A. suum</i>	169 RNPVTHLKDPNMMWDFWLSLRP	189
93. Catalasa <i>C. jejuni</i>	146 RDPRTHLRSNNAAWDFWLSLCP	166
94. Catalasa <i>M. extorquens</i>	131 RDPRTHLKPHWRRWDFWLSLSP	151
95. Catalasa <i>S. cerevisiae</i> type A	169 RNPQTHLRDADMIWDFLTLTP	189
96. Catalasa <i>B. primigenius</i>	170 RNPQTHLKDPDMVWDFWLSLRP	190
97. Catalasa <i>C. elegans</i>	166 RNPQTHMRDPNALFDFWMNRP	186
98. Catalasa <i>P. djamor</i>	109 RDPQTHLKDADMFWDYLGQNP	129
99. Catalasa <i>T. gondii</i>	159 RHPQTHLHDPNMVWDFWLSLVP	179
100. Catalasa <i>C. familiaris</i>	170 RNPQTHLKDPDMVWDFWLSLRP	190
101. Catalasa <i>S. scrofa</i>	170 RNPQTHLKDPDMVWDFWLSLRP	190
102. Catalasa <i>M. extorquens</i>	131 RDPRTHLKPHWRRWDFWLSLSP	151

Otras proteínas

103. Pax-8 <i>H. sapiens</i>	345	RCPDTHPTSPPADRAAMPPLP	365
104. L9 <i>M. leprae</i>	118	RLPKTHIKAVGTHPVSVHLHP	138
105. L9 <i>M. tuberculosis</i>	118	RLPKTHIKAVGTHFVSVHLHP	138
106. ABC trans(hyp) <i>H. Influenzae</i>	197	RSPETHQTALSAVILPEGNAP	217
107. 12.1 kD retrovirus <i>H. Sapiens</i>	23	RAPLTHKMNMVTSEEQMKLP	43
108. C40C9.2. <i>C. elegans</i>	340	RKPETHEMSPFLRELLLIWLP	360
109. T05C12.2. <i>C. elegans</i>	304	RKPETHEMSPTMRKIFIDWLP	324
110. 20.7 kD <i>E. coli</i>	175	RPPPTHAPMMVAMTLAAVAP	195
111. \approx P140 Alcelaphine herpesvirus			
	227	RIPYTHVVRFIDRWEIRVRVP	247

Proteínas de fusión

Mediante la técnica de PCR recursivo, se sintetizaron los fragmentos de DNA correspondientes a la secuencia que codifica el motivo RXPXTH(X)₁₄P, más 23 residuos hacia el amino y 15 hacia el carboxilo de la subunidad α muscular de ratón y de la catalasa hepática de bovino. Cada fragmento constó de 177 bases con codones preferentes para *E. coli*. Una vez obtenidos los fragmentos se clonaron exitosamente en el plásmido pGEX-3X en los sitios EcoRI y BamHI respectivamente.

Las clonas de interés fueron aisladas mediante hibridización en colonia y secuenciadas manualmente. Se realizaron purificaciones de DNA en gran escala y se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α . Se realizaron cultivos bacterianos durante 2 horas, a 30° C con 0.1 μ M de IPTG en el medio. El cultivo celular fue sonificado y la proteína de fusión purificada mediante columnas de agarosa-glutatin. La fracción eluida fue recuperada y la presencia del péptido fue corroborada en geles de acrilamida.

Desafortunadamente, no fué posible el aislamiento de las proteínas de fusión producidas, debido a problemas propios de la técnica. En el caso de la proteína de fusión GST-nAChmotif, la elución de la columna no fué exitosa, ya que al analizar los geles de acrilamida, la banda con el peso molecular de la proteína de fusión se encontró en todos los pasos del proceso, pero no en la elución. Consideremos que debido a alguna propiedad intrínseca de la proteína, esta permanecía unida a la columna aún después de la elución con glutatin reducido. La proteína de fusión GST-catalasamotif, no fue encontrada en los pasos

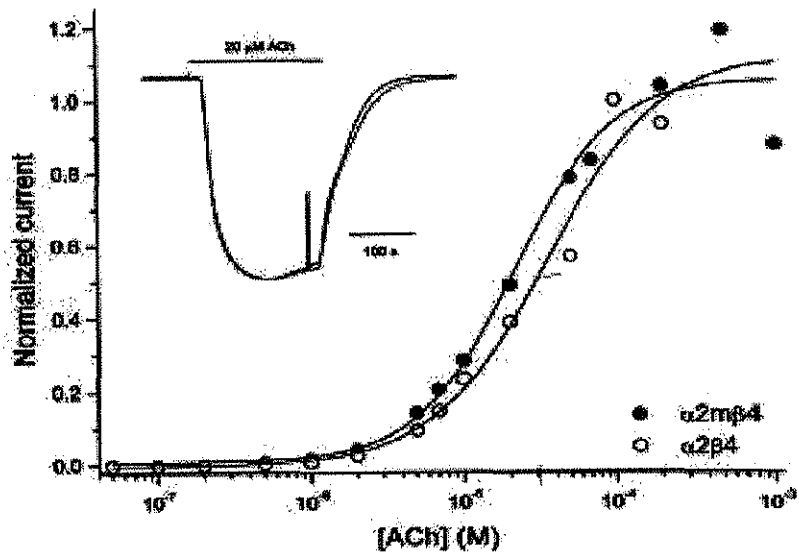
siguientes a la sonicación del pellet bacteriano, lo que sugiere la existencia de un fenómeno de compartimentalización, por lo que al pasar a través de la columna de agarosa-glutación, la proteína no se unió a esta, perdiéndose en los lavados.

Deleciones del motivo RXPXTH(X)₁₄P

Delección de la P final del motivo en la subunidad $\alpha 2$ de rata ($\alpha 2\Delta 352$)

Mediante la técnica de PCR se logró la delección de la P final del motivo. La secuencia fué corroborada mediante secuenciación manual con ³²P. El DNA fué purificado mediante una preparación a gran escala. Posteriormente se realizó una transcripción *in vitro* para obtener el RNAm, el cual fué inyectado en ovocitos de *Xenopus*. La proporción inyectada de $\alpha 2$ ($\Delta P352$) y $\beta 2$ silvestre (wt) fué 1:1. Se registraron las corrientes producidas por acetilcolina mediante fijación de voltaje con dos electrodos. No se encontró ningún cambio significativo en la cinética ni en la amplitud de la corriente producida por el ligando en el receptor mutante respecto al receptor control ($\alpha 2$ wt $\beta 4$ wt, 1:1)(Fig. 3 A). Para analizar la relación corriente-voltaje del receptor mutado se aplicó un protocolo de pulso cuadrados desde -140 mV hasta 40 mV con incrementos de +20 mV. No se observó ningún cambio en la dependencia de voltaje de la corriente en el receptor mutado respecto al control (Fig 3 B).

En otra serie de experimentos se inyectaron diferentes proporciones de la subunidad mutada y de la subunidad silvestre, con el fin de observar si existía algún efecto sumatorio de la corriente producida al ensamblarse el receptor mutant y el receptor normal, o si podría ocurrir algún fenómeno de desplazamiento que hablara de una mayor afinidad por la subunidad wt que por la mutada. Se analizó la corriente total producida por cada combinación y se comparó con la corriente del receptor control. No se encontró ningún cambio significativo al comparar las proporciones 1:1 de $\alpha 2\beta 4$ vs $\alpha 2(\Delta P352)\beta 4$, o 1:1:1, 0.5:0.5:1, 1:2:1 de $\alpha 2$: $\alpha 2(\Delta P352)$: $\beta 4$ vs $\alpha 2\beta 4$. Sin embargo al inyectar una proporción 0.2:0.8:1 de $\alpha 2$: $\alpha 2(\Delta P352)$: $\beta 4$ se encontró una disminución significativa de la amplitud de la corriente respecto a las demás combinaciones. Este dato es difícil de interpretar ya que se muestra la corriente no normalizada, lo que podría enmascarar un problema en el tamaño del ovocito y no reflejar una medida del ensamblaje del receptor (Fig 4).



B)

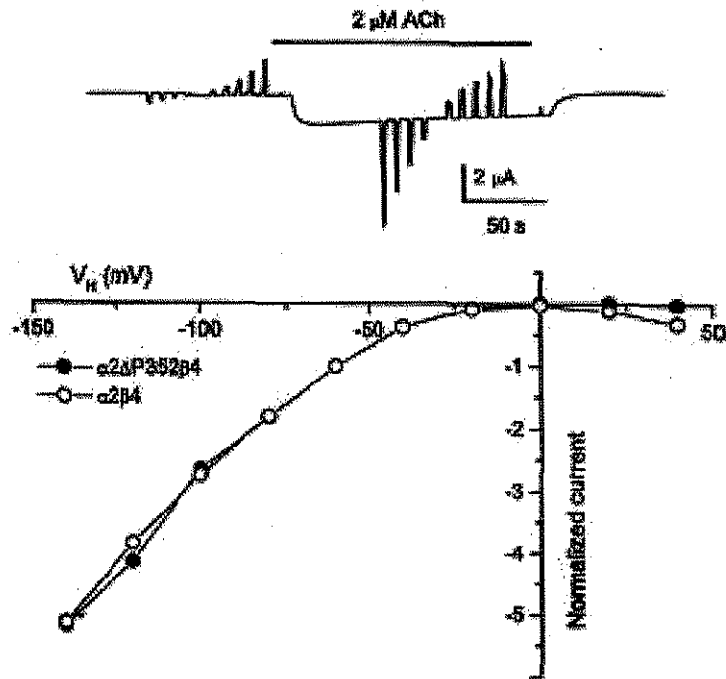


Figura 3. Efecto de la delección de la P final del motivo en la subunidad α_2 . A) Curva dosis-respuesta de la corriente producida por concentraciones crecientes de ACh en el receptor mutado y en el control. B) Curva I-V del receptor mutado y del control.

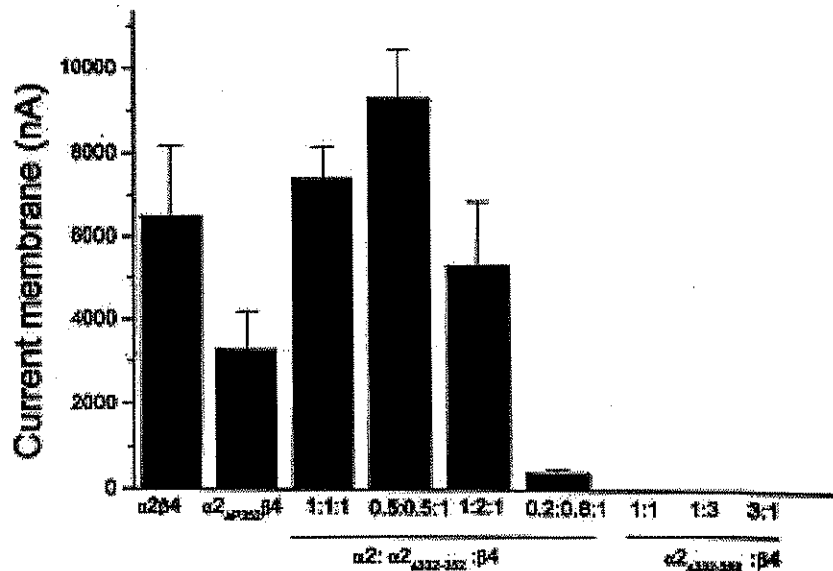


Figura 4. Inyección de diferentes proporciones de subunidad mutada:subunidad silvestre. Se inyectaron diferentes proporciones de subunidades mutadas $\alpha 2(\Delta 352)$ y $\alpha 2(\Delta 332-352)$ con $\beta 4$ wt. La gráfica muestra la corriente total producida por 100 μ M de ACh en el baño.

Delección del motivo en $\alpha 2$ ($\alpha 2 \Delta 332-352$)

La expresión del receptor formado por las subunidades $\alpha 2(\Delta 332-352)$ y $\beta 4$ en ovocitos no produjo ninguna corriente detectable al aplicar en la perfusión acetilcolina o nicotina (Fig 4, Fig 5).

Delección del motivo en $\beta 4$ ($\beta 4 \Delta 321-341$)

El receptor mutante, resultante de la inyección de las subunidades $\alpha 2$ y $\beta 4(\Delta 321-341)$, no produjo ninguna corriente detectable al aplicar en la perfusión acetilcolina o nicotina (Fig 5)

Delección de seis aminoácidos del motivo en $\beta 4$ ($\beta 4 \Delta 321-326$)

La inyección de la subunidad $\alpha 2$ y la subunidad mutada $\beta 4(\Delta 321-326)$ produjo un receptor mutante en el que se observaron características interesantes. La respuesta de este

receptor a la exposición de ACh 100 μ M fué sólo un 0.45% de la respuesta producida por el receptor $\alpha 2\beta 4$ al ser expuesto a la misma concentración de agonista. El mismo comportamiento fué observado cuando se aplicó nicotina (Fig 5). Con el fin de observar el comportamiento de la corriente al variar el potencial de membrana se aplicó un protocolo de pulsos cuadrados desde -140 mV hasta +40 mV con pulsos despolarizantes de 20 mV, sobre la corriente evocada por ACh 100 μ M (Fig 6). En el receptor $\alpha 2\beta 4(\Delta 321-326)$ se observó un cambio en el comportamiento de la corriente a los voltajes hiperpolarizados desde -70 mV, lo que pone de manifiesto un cambio en las propiedades de conductividad del canal mutante respecto al control. Es interesante notar que a voltajes mayores a -70mV, el comportamiento de ambos receptores es similar.

Al exponer al receptor mutado a concentraciones crecientes de ACh, se observó la presencia de corrientes detectables a concentraciones más bajas de ACh que en el receptor control, lo que podría indicar un cambio en la afinidad del receptor por su ligando. Como se mencionó anteriormente, la exposición del receptor mutado a ACh 100 μ M produjo una corriente que representa sólo un 0.45% de la corriente producida por la misma concentración de agonista en el receptor control. Este dato tiene al menos dos posibles interpretaciones: una menor cantidad de receptores presentes en la superficie del ovocito o una alteración de las propiedades del canal. El cambio de pendiente de la relación I-V y el desplazamiento de la curva dosis-respuesta hacia la derecha, nos inclina a pensar en un cambio en las propiedades del receptor al eliminar los 6 aminoácidos iniciales del motivo, sin embargo, se requieren más experimentos para explicar con certeza estos hallazgos.

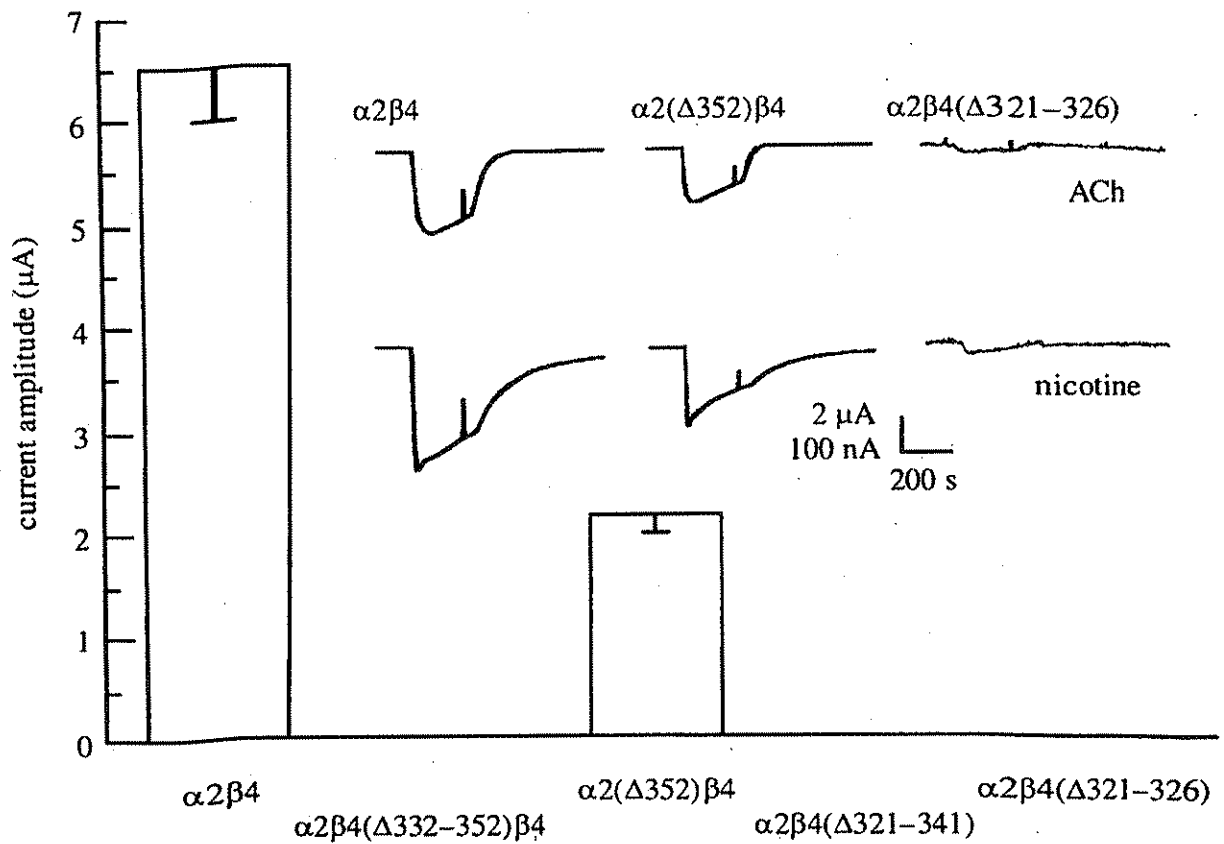
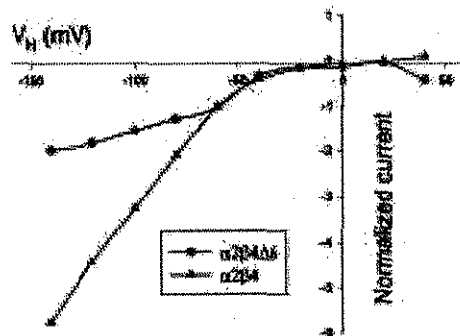


Figura 5. Resumen de las corrientes producidas por ACh 100 μM en ovocitos inyectados con subunidades mutadas o silvestre. Las columnas muestran el promedio de la amplitud de la corriente ($\pm ESM$) en 10-18 ovocitos (tres o cuatro donadores). En la parte superior se muestran las corrientes evocadas por acetilcolina 100 μM o nicotina 100 μM en ovocitos expresando $\alpha 2\beta 4$, $\alpha 2(\Delta 352)\beta 4$ y $\alpha 2\beta 4(\Delta 321-326)$.

A



B

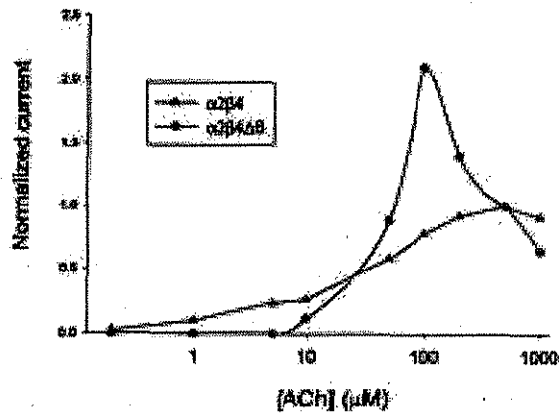


Figura 6. Efecto de la deleción de los 6 aminoácidos iniciales del motivo RXPXTH(X)₁₄P en la subunidad $\beta 4$. A) Relación I-V en el receptor $\alpha 2\beta 4$ y $\alpha 2\beta 4(\Delta 321-326)$. Se aplicó un protocolo de pulsos cuadrantes despolarizantes desde -140 mV hasta $+40$ mV a la corriente producida por la aplicación de ACh $100 \mu\text{M}$. B) Curva dosis-respuesta a ACh de los receptores $\alpha 2\beta 4$ (●) y $\alpha 2\beta 4(\Delta 321-326)$ (○).

DISCUSIÓN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Mucho es lo que sabemos actualmente de las diferentes subunidades del RnACh. Se conoce la estructura primaria de las diversas subunidades y a grandes rasgos las dimensiones, parte de la estructura secundaria de los diferentes dominios incluyendo el transmembranal, el plegamiento de las regiones transmembranales y la estructura y posición de las modificaciones post-transcripcionales. Se tiene una idea clara de la estructura terciaria de los sitios de unión de agonistas y antagonistas, del poro del canal y del área que otorga selectividad. Se conoce la estructura cuaternaria así como el arreglo pseudosimétrico de las diferentes subunidades alrededor del eje central. Pero, qué no se conoce? No se conoce mucho acerca de la estructura y función de los dominios extramembranales (más allá de los sitios de unión del ligando, que son regiones muy pequeñas y cercanas a la membrana). No se conocen los detalles estructurales de los sitios de unión ni los cambios conformacionales involucrados en la apertura del canal que sigue a la unión del ligando. No se saben las bases estructurales que confieren las diferencias entre agonistas y antagonistas y, no se conoce la estructura y función de los dominios de las subunidades, que no están involucrados en la unión del ligando. En resumen, podríamos decir que lo que se piensa del receptor es mucho más de lo que se conoce con certeza y que, en ausencia de información estructural con resolución atómica, los datos existentes permiten proponer modelos estructurales posibles pero hipotéticos.

El presente trabajo propone el uso de abordajes distintos para inferir la posible estructura de una región de las subunidades del RnACh, de la que se tiene poca información estructural. Con el acceso prácticamente ilimitado que se tiene en la actualidad a los bancos de datos, es posible hacer uso de esa información para inferir la posible estructura de las proteínas. La descripción de motivos conservados en la naturaleza indica que existen semejanzas estructurales entre las diferentes secuencias de aminoácidos a las que llamamos proteínas.

La secuencia completa de aminoácidos de las subunidades del RnACh ha estado disponible por casi dos décadas, junto con datos de la estructura tridimensional provenientes de microscopía electrónica de baja resolución. Actualmente se tiene mucha información de la organización funcional del RnACh proveniente de experimentos de mutagénesis y otras técnicas como marcaje por afinidad, por lo que la idea de utilizar esta información para

realizar comparaciones estructurales con otras proteínas del banco de datos, ha sido tomada cada día más en serio.

Tsigelny *et al.*, (1997) realizó el modelaje de los dominios extracelulares de algunas subunidades del RnACh utilizando la homología en secuencia que encontró en proteínas que unen cobre como la plastocianina y la pseudoazurina, de las cuales se conocía la estructura cristalográfica. Las secuencias entre los residuos 31 y 164 de la subunidad α y los residuos correspondientes en otras subunidades homólogas del receptor mostraron similitud con la secuencia que forma el sitio de unión del cobre en la plastocianina y pseudoazurina. En otro esfuerzo por proponer una estructura tridimensional para el dominio N-terminal del RnACh, Corringer *et al* (2000) realizaron un modelaje del plegamiento basados en la inmunoglobulina. Aún cuando ellos no comparan secuencias, su hipótesis muestra la idea de utilizar la información existente proveniente de otras proteínas de las que se tiene mas información.

El presente trabajo es un esfuerzo por proponer una posible estructura tridimensional de un área muy particular en las subunidades del receptor nicotínico. Para este fin se utilizaron dos abordajes: el análisis de secuencias y estructuras, y la mutagénesis dirigida. Mediante el análisis de secuencias se encontró la existencia de un motivo conservado en el receptor nicotínico y en la catalasa. Las similitudes a nivel de estructura primaria y secundaria de ambos motivos, inevitablemente proponen la posible similitud en la estructura tridimensional, que ha sido resuelta en el caso de la catalasa y a la que se le asigna un papel importante en la estabilización de la estructura cuaternaria de la proteína.

Para investigar la posible importancia funcional de este motivo en el RnACh, se realizaron diferentes "deleciones" en la secuencia de las subunidades α_2 y β_4 . Por medio de esta técnica se demostró que la manipulación de dicho motivo en las subunidades del receptor afecta la respuesta a ACh del receptor y quizá su ensamblaje. En 1994, Yu y Hall realizaron deleciones de segmentos de 8 a 13 aminoácidos del asa citoplásmica mayor en la subunidad α de ratón para determinar por medio de ensayos de unión la capacidad de las subunidades mutadas para formar RnACh al ser co-expresadas con subunidades no-mutadas β , δ y ϵ . La subunidad α en la que se eliminaron los aminoácidos 323-332 (entre los que se encuentran los aminoácidos iniciales del motivo aquí descrito), produjo sólo un 27% de receptores ensamblados respecto al 100% producido por la subunidad no-mutada. Sin embargo,

deleciones de segmentos cercanos a la región carboxilo-terminal del asa citoplásmica producen un efecto más drástico en el ensamblaje permitiendo sólo un 1% de ensamblaje. Si bien los autores muestran la importancia del asa citoplásmica mayor en el proceso de ensamblaje del RnACh, se requieren experimentos más detallados para determinar el papel del motivo aquí descrito en el proceso de ensamblaje.

Una función bien conocida del asa citoplásmica mayor es mediar la unión del RnACh al citoesqueleto. La acumulación de RnACh es una característica distintiva de las membranas postsinápticas en la unión neuromuscular y se cree es debida a la interacción del receptor con proteínas del citoesqueleto (Froehner, 1999; Hall y Sanes, 1993). Una de esas proteínas es la rapsina, también llamada 43 kDa, la cual es una proteína intracelular periférica de membrana, colocalizada con los RnACh de manera equimolar y esencial para la acumulación de los receptores en la postsinapsis (Burden *et al.*, 1983; LaRochalle y Froehner, 1990). Los ratones mutantes en los cuales se interrumpe el gen de la rapsina, mueren dentro de las primeras horas después del nacimiento debido a defectos en la unión neuromuscular incluyendo la pérdida de los "parches" de RnACh en la membrana. (Gautam *et al.*, 1995). Estudios de mutagénesis en la rapsina sugieren que la región N-terminal dirige la unión de la proteína a la membrana y que un motivo "coiled coil" o de cilindro, media la asociación con el RnACh (Ramarao and Cohen, 1998; Phillips *et al.*, 1991).

Si bien se conocen los dominios funcionales de la rapsina, poco se sabe de los sitios en el RnACh responsables de la unión con esta proteína. Se ha propuesto que la rapsina interactúa con el receptor a través de los dominios intracelulares de este (Bloch y Froehner, 1987; Toyoshima y Unwin, 1988). En experimentos en los que se co-expresan la rapsina y subunidades α de ratón del RnACh truncadas o con "deleciones", se mostró que la ausencia de algunas regiones en el asa citoplásmica mayor, disminuye la habilidad de las subunidades para colocarse con la rapsina en parches en la membrana. La eliminación de los aminoácidos 307-355 o 307-403 disminuye aproximadamente un 60% la colocación de la rapsina y la subunidad α en fibroblastos QT6 (Maimone y Enigk, 1999). Este dato sugiere que esa región podría estar mediando la unión de la rapsina con las subunidades del RnACh. Cabe señalar que en la subunidad α de ratón, el motivo RXPXTH(X)14P se encuentra entre los aminoácidos 321-341, por lo que la posibilidad de que esta región este involucrada en la unión proteína-proteína se fortalece.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La idea de que un pequeño cambio en una región particular de un monómero puede afectar el comportamiento de toda una proteína ha sido demostrada una y otra vez en proteínas como las enzimas, los receptores-canal y los receptores metabotrópicos. Ésta y otras características han sido descritas en el fenómeno del alosterismo. Varias propiedades de los RnACh permiten describirlos como una clase especial de proteínas alostéricas (Galzi y Changeux, 1994). Por ejemplo: a) la unión del ligando y la apertura del canal son fenómenos cooperativos, lo que significa que se requieren dos moléculas de ligando uniéndose en lugares distintos del receptor para producir un cambio estructural que permita la apertura del canal. b) Los dominios funcionales del receptor son regiones alejadas dentro de la proteína que interactúan indirectamente a través de cambios conformacionales. c) El RnACh se compone de más de una cadena polipeptídica, lo cual es un requisito indispensable para la regulación alostérica. d) Finalmente, el receptor existe en al menos tres estados funcionales: reposo, activo y desensibilizado. Estas características podrían ser la clave para explicar que deleciones de un aminoácido en el motivo aquí descrito pudieran afectar el ensamblaje del receptor, la unión del ligando, las propiedades del canal o la unión al citoesqueleto, como se ha demostrado mediante otros estudios de mutagénesis en el poro del canal y los sitios de unión al ligando.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PERSPECTIVAS

Es claro que se requieren una serie de estudios encaminados a determinar de manera concluyente si la estructura tridimensional del motivo RXPXTH(X)₁₄P en el RnACh corresponde a aquella del motivo de la catalasa y, si este motivo es necesario en el proceso de ensamblaje del receptor o en la unión a proteínas del citoesqueleto. Con el fin de determinar si ambas estructuras tridimensionales son semejantes, los péptidos codificados en las proteínas de fusión descritas en este trabajo serán de gran ayuda para resolver la estructura por cristalografía de rayos X o mediante la técnica de RMN. De la obtención de la estructura tridimensional del motivo en el RnACh y en la catalasa, emergerán dos posibilidades: 1) el motivo en ambas proteínas posee la misma estructura, o, 2) el motivo en el RnACh no es semejante al motivo en la catalasa. Si bien el presente trabajo sustenta la idea de que la estructura del motivo será la misma en ambas proteínas, la resolución de la estructura *per se* aportará nueva información de esta región del receptor de la que hasta la fecha se conoce muy poco.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

REFERENCIAS

Adler, L. E., Hoffer, L.D., Wiser, A., Freedman, R. (1993) Normalization of auditory physiology by cigarette smoking in schizophrenic patients. *Am. J. Psychiatry* 150:1856-1861

Adler, L.E., Hoffer, L.J., Griffith, J., Waldo, M.C., Freedman, R. (1992) Normalization by nicotine of deficient auditory sensory gating in the relatives of schizophrenics. *Biol. Psychiatry* 20:1284-1296

Adler, L.E., Waldo, M.C., Freedman, R. (1985) Neurophysiologic studies of sensory gating in schizophrenia: comparison of auditory and visual responses. *Biol. Psychiatry* 20:1284-1296

Alkondon, M., Albuquerque, E. X. (1993) Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. Part I: Pharmacological and functional evidence for distinct structural subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265:1455-1473

Altschul, S.F. Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402

Anand, R., Conroy, W.G., Schoepfer, R., Whiting, P., Lindstrom, J. (1991) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes have a pentameric quaternary structure. *J. Biol. Chem.* 266:11192-11198

Arita, M., Wada, A., Takara, H., Izumi, F. (1987) Inhibition of ^{22}Na influx by tricyclic and tetracyclic antidepressants and binding of [^3H]imipramine in bovine adrenal medullary cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 243:342-348

Arnold, S.E., Trojanowski, J.Q. (1996) Recent advances in defining the neuropathology of schizophrenia. *Acta Neuropathol. (Berl)* 92:217-231

Aubert, I., Rowe, W., Meaney, M.J., Gauthier, S., Quirino, R. (1995) Cholinergic markers in aged cognitively impaired Long-Evans rats. *Neuroscience.* 67(2):277-92.

Aubert, I., Araujo, D.M., Cecyre, D., Robitaille, Y., Gauthier, S., Quirino, R. (1992) Comparative alterations of nicotinic and muscarinic binding sites in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J. Neurochem.* 58:529-541

Balfour, D.J., Fagerstrom, K.O. (1996) Pharmacology of nicotine and its therapeutic use in smoking cessation and neurodegenerative disorders. *Pharmacol. Ther.* 72:51-81

Baron, M., Norman, D.G., Campbell, I.D. (1991) Protein modules. *Trends Biochem. Sci.* 16(1):13-7

Beani, L., Bianchi, C., Nilsson, L., Nordberg, A., Romanelli, L., Sivilotti, L. (1985) The effect of nicotine and cytosine on ^3H -acetylcholine release from cortical slices of guinea-pig brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 331:293-296

Benwell, M.E., Balfour, D.J., Anderson, J.M. (1988) Evidence that tobacco smoking increases the density of (-)-[^3H] nicotine binding sites in human brain. *J. Neurochem.* 50: 1243-1242

Bernstein, F.C., Koetzle, T.F., Williams, G.J.B., Meyer, E.F. Jr., Brice M.D., Rodgers, J.R. et al. (1977) The Protein Data Bank: a computer based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.* 112:535-542

- Berriman, J.A., Unwin, N.** (1994) Analysis of transient structures by cryo-microscopy combined with rapid mixing of spray droplets. *Ultramicroscopy* 56:241-252
- Bertrand, D., J. P. Changeux** (1999). "Nicotinic receptor: a prototype of allosteric ligand-gated ion channels and its possible implications in epilepsy." *Adv. Neurol.* 79:171-88.
- Bertrand, D., Valera, S., Bertrand, S., Ballivet, M., Rungger, D.** (1991) Steroids inhibit nicotinic acetylcholine receptors. *Neuroreport* 2:277-280
- Bertrand, S., Weiland, S., Berkovic, S.F., Steinlein, O.K., Bertrand, D.**, (1998) Properties of neuronal nicotinic acetylcholine receptor mutants from humans suffering from autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Br. J. Pharmacol.* 125:751-760
- Bloch, R.J., Froehner, S.C.** (1987) The relationship of the postsynaptic 43K protein to acetylcholine receptors in receptor clusters isolated from cultured rat myotubes. *J. Cell Biol.* 104: 645-654
- Breese, C.R., Marks, M.J., Logel, J., Adams, C.E., Sullivan, B., Collins, A.C., Leonard, S.** (1997) Effect of smoking history on [³H] nicotine binding in human postmortem brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282:7-13
- Brenner, S.E., Chothia, C., Hubbard, T.J.** (1998) Assessing sequence comparison methods with reliable structurally identified distant evolutionary relationships. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 26:6073-6078
- Breslau, N., Peterson, E.L., Schultz, L.R., Chilcoat, H.D., Andreski, P.** (1998) Major depression and stages of smoking. A longitudinal investigation. *Arch. Gen. Psychiatric* 55:161-166
- Breslau, N., Kilbey, M.M., Andreski, P.** (1993) Nicotine dependence and major depression. New evidence from a prospective investigation. *Arch. Gen. Psychiatric* 50:31-35
- Brisson, A., Unwin, P.N.T.** (1985) Quaternary structure of the acetylcholine receptor. *Nature* 315:693-695
- Brisson, A., Unwin, P.N.T.** (1984) Tubular crystals of acetylcholine receptor. *J. Cell. Biol.* 99:1202-1211
- Burden, S.J., DePalma RL, Gottesman, G.S.** (1983) Crosslinking of proteins in acetylcholine receptor-rich membranes: association between the beta-subunidad and the 43 kDa subsynaptic protein. *Cell* 35:687-692
- Caggiula, A.R., Donny, E.C., Epstein, L.H., Sved, A.F., Knopf, S., Rose, C., McAllister, C.G., Antelman, S.M., Perkins, K.A.** (1998) The role of corticosteroids in nicotine's physiological and behavioral effects. *Psychoneuroendocrinology* 23:143-159
- Cartaud, J., Benedetti, E.L., Come, J.B., Meunier, J.C., Changeux, J.P.** (1973) Presence of a lattice structure in membrane fragments rich in nicotinic receptor protein from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *FEBS Lett.* 33:109-113
- Colrain, I.M., Mangan, G.L., Pellet, O.L., Bates, T.C.** (1992) Effects of post-learning smoking on memory consolidation. *Psychopharmacology (Berl)* 108:448-451
- Couturier, S., Bertrand, D., Matter, J.M., Hernández, M.C., Bertrand, S., Millar, N., Valera, S., Barkas, T., Ballivet, M.** (1990) A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunidad (alpha 7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by alpha-BTX. *Neuron* 5:847-856
- Covey, L.S., Glassman, A.H., Stetner, F.** (1997) Major depression following smoking cessation. *Am. J. Psychiatric* 154:263-265
- Covey, L.S., Glassman, A.H., Stetner, F.** (1998) Cigarette smoking and major depression. *J. Addict Dis.* 17:35-46

- Coyle, J.T., Price, D.L., deLong, M.R.** (1983) Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* 219: 1184-1190
- Croxen, R., Newland, C., Beeson, D., Oosterhuis, H., Chauplannaz, G., et al.** (1997) Mutations in different functional domains of the human muscle acetylcholine receptor alpha subunidad in patients with the slow-channel congenital myasthenic syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 6:767-74
- Changeux, J.P., Edelstein, S.J.** (1998) Allosteric receptors after 30 years. *Neuron* 21:959-980
- Changeux, J.P., Galzi, J-L., Devilliers-Thiery, A., Bertrand, D.** (1992) The functional architecture of the acetylcholine nicotinic receptor explored by affinity labelling and site-directed mutagenesis. *Q. Rev Biophys* 25:395-432
- Chini, B., Raimond, E., Elogien, A.B., Moralli, D., Balzaretto, M., Heinemann, S.** (1994) Molecular cloning and chromosomal localization of the human alpha 7-nicotinic receptor subunidad gene (CHRNA7). *Genomics* 19:379-381
- Chothia, C.** (1993) One thousand families for the molecular biologist. *Nature* 357:543-544
- Corringer, P. J., N. Le Novere, et al.** (2000). "Nicotinic receptors at the amino acid level." *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40:431-58
- Dalack, G.W., Glassman, A.H., Rivelli, S., Covey, L., Stetner, F.** (1995) Mood, major depresión, and fluoxetine response in cigarette smoker. *Am. J. Psychiatry* 152:398-403
- Dani, J.A., Heinemann, S.** (1996) Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. *Neuron* 16:905-908
- Darlison, M. G., M. L. Hutton, et al.** (1993). "Molluscan ligand-gated ion-channel receptors." *Exs* 63:48-64
- Decker, M.W.** (1995) Animal models of cognitive function. *Crit. Rev. Neurobiol.* 9:321-343
- Decker, M.W., Brioni, J.D., Bannon, A.W., Arneric, S.P.** (1995) Diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: lessons from behavior and implications for CNS theapeutics. *Life Sci.* 56: 545-570
- Decker, M.W., Brioni, J.D., Sullivan, J.P., Bucle, M.J., Radek, R.J., Raszkiewicz, J.L., Kang, C.H., Kim, D.J., Giardina, W.J., Wasicak, J.T. et al.** (1994) (S)-3-methyl-5-(1-methyl-2-pyrrolidiny-1)isoxazole (ABT 418): a novel cholinergic ligand with cognition-enhancing and anxiolytic activities. Part II: *In vivo* characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270:319-328
- Decker, M.W., Majchrzak, M.J., Arneric, S.P.** (1993) Effects of lobeline, a nicotinic receptor agonista, on learning and memory. *Pharmacol. Biochem.* 45: 571-576
- Doolittle, R.F.** (1995) The multiplicity of domains in proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 64:287-314
- Dursun, S.M., Revely, M.A.** (1997) Differential effects of transdermal nicotine on microstructured analices of tics in Tourette's síndrome: an open study. *Psychol. Med.* 27:483-487
- Edelstein, S.J., Schaad, O., Changeux, J.P.** (1997a) Myasthenic nicotinic receptor mutant interpreted in terms of the allosteric model. *C.R. Acad. Sci. Paris* 320:953-961
- Edelstein, S., Schaad, O., Changeux, J.P.** (1997b) Single binding versus single channel recordings: a new approach to study ionotropic receptors. *Biochemistry* 36:13755-13760

Elliott, K.J., Ellis, S.B., Berckhan, K.J., Urrutia, A., Chavez-Noriega, L.E., Jonson, E.C., Velicelebi, G., Harpold, M.M. (1996) Comparative structure of human neuronal alpha 2-alpha 7 and beta 2-beta 4 nicotinic acetylcholine receptor subunidades and functional expresión of the alpha 2, alpha 3, alpha 4, alpha 7, beta 2, and beta 4 subunidades. *J. Mol. Neurosci.* 7:217-228

Engel, A.G., Ohno, K., Milone, M., Wang, H.L., Nakano, S., Bouzat, C., Pruitt, J.N., Hutchinson, D.O., Brengman, J.M., Bren, N., Sieb, J.P., Sine, S.M. (1996) New mutations in acetylcholine receptor subunidad genes reveal heterogeneity in the slow-channel congenital myasthenic syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 5:1217-1227

Fairclough, R.H., Josephs, R., Richman, D.P. (1993) Imaging ligand binding sites on the Torpedo acetylcholine receptor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 681:113-125

Fleming, J. T., C. Tornoe, et al. (1993). "Acetylcholine receptor molecules of the nematode *Caenorhabditis elegans*." *Exs* 63:65-80 1993

Flynn, D.D., Mash, D.C. (1986) Characterization of L-[³H]nicotine binding in human cerebral cortex: comparison between Alzheimer's disease and the normal. *J. Neurochem.* 47:1948-1954

Freedman, R., Coon, H., Myles-Worsley, M., Orr-Urtreger, A., Olincy, A., Davis, A., Polymeropoulos, M., Holik, J., Hopkins, J., Ho, M., Rosenthal, J., Waldo, M.C., Reimherr, F., Wender, P., Yaw, J., Young, D.A., Breese, C.R., Adams, C., Patterson, D., Adler, L.E., Kruglyak, L., Leonard, S., Byerley, W. (1997) Linkage of a neurophysiological deficit in schizophrenia to a chromosome 15 locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:587-592

Freedman, R., Hall, M., Adler, L.E., Leonard, S. (1995) Evidence in postmortem brain tissue for decreased numbers of hippocampal nicotinic receptors in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 38:22-33

Froehner, S.C. (1991) The submembrane machinery for nicotinic acetylcholine receptor clustering. *J. Cell Biol.* 114:1-7

Fryer, J.D., Lukas, R.J. (1999) Antidepressants noncompetitively inhibit nicotinic acetylcholine receptor function. *J. Neurochem.* 72:1117-1124

Fuxe, K., Janson, A.M., Jansson, A., Andersson, K., Eneroth, P., Agnati, L.F. (1990) Chronic nicotine treatment increases dopamine levels and reduces dopamine utilization in substantia nigra and in surviving forebrain dopamine nerve terminal system after a partial diencephalic hemitranssection. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 341:171-181

Galzi, J.L., Edelstein, S.J., Changeux, J. (1996) The multiple phenotypes of allosteric receptors mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:1853-1858

Galzi, J.L., Changeux, J.P. (1995) Neuronal nicotinic receptors: molecular organization and regulations. *Neuropharmacol.* 34:563-582

Galzi, J.L., Changeux, J.P. (1994) Neurotransmitter-gated ion channels as unconventional allosteric proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol* 4:554-565

Garcia-Colunga, J., Awad, J.N., Miledi, R. (1997) Blockage of muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors by fluoxetine (Prozac). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:2041-2044

Gautam, M., Noakes, P.G., Mudd, J., Nichol, M., Chu, G.C., Sanes, J.R., Merlie, J.P. (1995) Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature* 377:232-236

Gerschenfeld, H. M. (1973). "Chemical transmission in invertebrate central nervous systems and neuromuscular junctions." *Physiol. Rev.* 53(1):1-119.

- Glassman, A.H., Helzer, J.E., Xovey, L.S., Cottler, L.B., Stetner, F., Tipp, J.E., Jonson, J.** (1990) Smoking, cessation, and major depression. *Jama* 264:1546-1549
- Glassman, A.H., Stetner, F., Walsh, B.T., Raciman, P.S., Fleiss, J.L., Cooper, T.B., Covey, L.S.** (1988) Heavy smokers, smoking cessation, and clonidine. Results of a double-blind, randomized trial. *Jama* 259:2863-2866
- Gomez C. M., R. Maselli, et al.** (1996). "A beta-subunidad mutation in the acetylcholine receptor channel gate causes severe slow-channel syndrome." *Ann. Neurol.* 39:712-23.
- Gorbounova, O., Svensson, A.L., Jonsson, P., Mousavi, M., Miao, H., Hellstrom-Lindahl, E., Nordberg, A.** (1998) Chronic ethanol treatment decreases [³H]epibatidina and [³H]nicotine binding and differentially regulates mRNA levels of nicotinic acetylcholine receptor subunidades expressed in M10 and SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* 70:1134-1142
- Gotti, C., Fornasari, D., Clementi, F.** (1997) Human neuronal nicotinic receptors. *Prog. Neurobiol.* 53:199-237.
- Grun, E.A., Pauly, J.R., Collins, A.C.** (1992) Adrenalectomy reverses chronic injection-induced tolerance to nicotine. *Psychopharmacology (Berl)* 109:299-304
- Guan Z. Z., X. Zhang, et al.** (1999). "Decreased protein level of nicotinic receptor alpha7 subunidad in the frontal cortex from schizophrenic brain." *Neuroreport* 10(8):1779-82.
- Hall, ZW., Sanes, J.R.** (1993) Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Neuron (Suppl)* 10:99-121
- Hennings, E.C., Kiss, J.P., Bici, E.S.** (1997) Nicotinic acetylcholine receptor antagonist effect of fluoxetine in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 759:292-294
- Hogue, C.W.V., Ohkawa, H., Bryant, S.H.** (1996) WWW-Entrez and the molecular modelling database. *Trends Biochem. Sci.* 21:226-229
- Holm, L., Sander, C.** (1993) Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J. Mol. Biol.* 233:123-138
- Holm, L., Sander, C.** (1996) Mapping the protein universe. *Science* 273:595-602
- Hsu, Y.N., Amin, J., Weiss, D.S., Wecker, L.** (1996) Sustained nicotine exposure differentially effects alpha 3 beta 2 y alpha 4 beta 2 neuronal nicotinic receptors expressed in *Xenopus* oocyte. *J. Neurochem.* 66:667-675
- Inoue, M., Kuriyama, H.** (1991) Somatostatin inhibits the nicotinic receptor - activated inward current in guinea pig chromaffin cells. *Biochem. Biophys. Res. Comun.* 174:750-775
- Islam, S.A., Luo, J., Sternberg, M.J.E.** (1995) Identification and analysis of domains in proteins. *Protein Eng.* 8:513-525
- Janson, A.M., Fuxe, K., Agnati, L.F., Jansson, A., Bjelke, B., Sundstrom, E., Andersson, K., Harstrand, A., Goldstein, M., Owman, C.** (1989) Protective effects of chronic nicotine treatment on lesioned nigrostriatal dopamine neurons in the male rat. *Prog. Brain Res.* 79:257-265
- Janson, A.M., Fuxe, K., Goldstein, M.** (1992) Differential effects of acute and chronic nicotine treatment on MPTP-(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) induced degeneration of nigrostriatal dopamine neurons in the black mouse. *Clin. Investig.* 70:232-238

Janson, A.M., Fuxe, K., Sundstrom, E., Agnati, L.F., Goldstein, M. (1988) Chronic nicotine treatment partly protects against the 1-methyl-4-phenyl-2,3,6-tetrahydropyridine-induced degeneration of nigrostriatal dopamine neurons in the black mouse. *Acta Physiol. Scan.* 132:589-591

Janson, A.M., Hedlund, P.B., Fuxe, K., von Euler, G. (1994) Chronic nicotine treatment counteracts dopamine D2 receptor up-regulation induced by a partial mesodiencephalic hemitranssection in the rat. *Brain Res.* 655:25-32

Janson, A.M., Moller, A. (1993) Chronic nicotine treatment counteracts cell loss induced by a partial mesodiencephalic hemitranssection: an analysis of the total number and mean volume of neurons and glia in substantia nigra of the male rat. *Neuroscience* 57:931-941

Jones, S., Stewart, M., Michie, A.D., Swindells, M.B., Orengo, C.A., Thornton, J.M. (1998) Domain assignment for protein structures using a consensus approach: characterisation and analysis. *Protein Sci.* 7:233-242

Jones, G.M., Sahakian, B.J., Levy, R., Warburton, D.M., Gray, J.A. (1992) Effects of acute subcutaneous nicotine on attention, information processing and shortterm memory in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology (Berl)* 180:485-494

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

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

Katz, B., Thesle, S. (1957) A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end plate. *J. Physiol.* 138:63-80

Ke, L., Lucas, R.J. (1996) Effects of steroid exposure on ligand binding and functional activities of diverse nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *J. Neurochem.* 67:1100-1112

Kihara, T., Shimohama, S., Urushitani, M., Sawasa, H., Kimura, J., Kume, T., Maeda, T., Akaike, A. (1998) Stimulation of alpha4-beta2 nicotinic acetylcholine receptors inhibits beta-amyloid toxicity. *Brain Res.* 792:331-334

Lange, K.W., Wells, F.R., Jenner, P., Marsden, C.D. (1993) Altered muscarinic and nicotine receptor densities in cortical and subcortical brain regions in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 60:197-203

LaRochelle, W.J., Froehner, S.C. (1986) Determination of the tissue distributions and relative concentrations of the post-synaptic 43-kDa protein and the acetylcholine receptor in Torpedo. *J. Biol. Chem.* 261:5270-5274

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

Leech C. A. and D. B. Sattelle (1993). "Acetylcholine receptor/channel molecules of insects." *Exs* 63:81-97.

Lena, C., Changeux, J.P. (1993) Allosteric modulations of nicotinic acetylcholine receptor. *Trends Neurosci.* 16:181-186

Lester, H.A. (1992) The permeation pathway of neurotransmitter gated ion channels *Annu. Rev. Biomol. Struc.* 21:267-292

Levin, E.D. (1992) Nicotinic systems and cognitive function. *Psychopharmacology (Berl)* 108:417-431

- Levin, E.D., Simon, B.B.** (1998) Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology (Berl)* 138:217-230
- Levin, E.D., Christopher, N.C., Briggs, S.J., Rose, J.E.** (1993) Chronic nicotine reverse working memory deficit caused by lesions of the fimbria or medial basalocortical projection. *Brain Res. Cogn. Brain Res.* 1:137-143
- Levin, E.D., Rose, J.E., Abood, L.** (1995) Effects of nicotinic dimethylaminoethyl esters on working memory performance of rats in the radial-arm maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 51:369-373
- Lindstrom, J. M.** (2000). "Acetylcholine receptors and myasthenia." *Muscle Nerve* 23(4):453-77.
- Lindström, J., Merlie, J., Yogeewarn, G.** (1979) Biochemical properties of acetylcholine receptor subunits from *Torpedo californica*. *Biochemistry* 18:4465-4470
- Lohr, J.B., Flynn, K.** (1992) Smoking and schizophrenia. *Schizophr. Res.* 8:93-102
- Lopez, M.G., Fonteriz, R.I., Gandia, L., de la Fuente, M., Villarroya, M., Garcia-Sancho, J., Garcia, A.G.** (1993) The nicotinic acetylcholine receptor of the bovine chromaffin cell, a new target for dihydropyridines. *Eur. J. Pharmacol.* 247:199-207
- Luetje, C. W., Patrick, J.** (1991) Both alpha- and beta- subunits contribute to the agonist sensitivity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurosci.* 11:837-845
- Maimone, M.M., Enigk, R.E.** (1999) The intracellular domain of the nicotinic acetylcholine receptor α subunit mediates its co-clustering with rapsyn. *Mol. Cell. Neurosci.* 14:340-354
- Maggio, R., Rive, M., Vaglini, F., Fornai, F., Molteni, R., Armogida, M., Racagni, G., Corsini, G.U.** (1998) Nicotine prevents experimental parkinsonism in rodents and induces striatal increase of neurotrophic factors. *J. Neurochem.* 71:2439-2446
- Marshall, D.L., Redfern, P.H., Wonnacott, S.** (1997) Presynaptic nicotinic modulation of dopamine release in the three ascending pathways studied by *in vivo* microdialysis: comparison of naive and chronic nicotine-treated rats. *J. Neurochem.* 68:1511-1519
- Martin, A.C., Orengo, C.A., Hutchinson, E.G., Jones, S., Karmirantzou, M., Laskowski, R.A., Mitchell, J.B., Taroni, C., Thornton, J.M.** (1998) Protein folds and function. *Structure* 6:875-884
- McConville, B.J., Sanberg, P.R., Fogelson, M.H., King, J., Cirino, P., Parker, K.W., Norman, A.B.** (1992) The effects of nicotine plus haloperidol compared to nicotine only and placebo nicotine only in reducing tic severity and frequency in Tourette's disorder. *Biol. Psychiatry* 31:832-840
- McCormick, D. A. and D. A. Prince** (1987). "Actions of acetylcholine in the guinea-pig and cat medial and lateral geniculate nuclei *in vitro*." *J. Physiol.* 392:147-65.
- McGehee, D.S., Role, L.W.** (1995) Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 57:521-546
- Miles, K., Greengard, P., Huganir, R.L.** (1989) Calcitonin gene-related peptide regulates phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor in rat myotubes. *Neuron* 2, 1517-1524
- Milone, M., H. L. Wang, et al.** (1997). "Slow-channel myasthenic syndrome caused by enhanced activation, desensitization, and agonist binding affinity attributable to mutation in the M2 domain of the acetylcholine receptor alpha subunit." *J. Neurosci.* 17:5651-65.

- Milone, M., Wang, H.L., Ohno, K., Prince, R., Fukudome, T., Shen, X.M., Brengman, J.M., Griggs, R.C., Sine, S.M., Engel, A.G.** (1998) Mode switching kinetics produced by a naturally occurring mutation in the cytoplasmic loop of the human acetylcholine receptor epsilon subunidad. *Neuron* 20:575-588
- Mitra, A.K., McCarthy, M.P., Stroud, R.M.** (1989) Three-dimensional structure of the nicotine acetylcholine receptor and location of the major associated 43-kD cytoskeletal protein, determined at 22Å by low dose electron microscopy and X-ray diffraction to 12.5Å. *J. Cell. Biol.* 109:755-774
- Mizuguchi, K., Deane, C.A., Blundell, T.L., Overington, J.P.** (1998) HOMSTRAD: a database of protein structure alignments for homologous families. *Protein Sci.* 7:2469-2471
- Mukherjee, S., Mahadik, S.P., Korenovsky, A., Laev, H., Schur, D.B., Reddy, R.** (1994) Serum antibodies to nicotinic acetylcholine receptors in schizophrenic patients. *Schizophr. Res.* 12:131-136
- Mulle, C., Lena, C., Changeux, J.P.** (1992) Potentiation of nicotinic receptor response by external calcium in rat central neurons. *Neuron* 8:937-945
- Murzin, A.G., Brenner, S.E., Hubbard, T., Chothia, C.** (1995) SCOP: a structural classification of the protein database for the investigation of sequence and structures. *J. Mol. Biol.* 247:536-540
- Nagata, K., Aistrup, G.L., Huang, C.S., Marszalec, W., Song, J.H., Yeh, J.Z., Narahashi, T.** (1996) Potent modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor-channel by ethanol. *Neurosci. Lett.* 217:189-193
- Newhouse, P.A., Potter, A., Corwin, J., Lenox, R.** (1992) Acute nicotinic blockade produces cognitive impairment in normal humans. *Psychopharmacology (Berl)* 108:480-484
- Newhouse, P.A., Potter, A., Levin, E.D.** (1997) Nicotinic system involvement in Alzheimer's and Parkinson's diseases. Implications for therapeutics. *Drugs Aging* 11:206-228
- Nordberg, A.** (1994) Human nicotinic receptors –their role in aging and dementia. *Neurochem. Int.* 25:93-97
- Nordberg, A., Winblad, B.** (1986) Reduced number of [³H]acetylcholine binding sites in the frontal cortex of Alzheimer brains. *Neurosci. Lett.* 72:115-119
- Nybäck, H., Nordberg, A., Langstrom, B., Halldin, C., Hartvig, P., Ahlin, A., Swahn, C.G., Sedvall, G.** (1989) Attempts to visualize nicotinic receptors in the brain of monkey and man by positron emission tomography. *Prog. Brain Res.* 79:313-319
- Octave, J.N.** (1995) The amyloid peptide and its precursor in Alzheimer's disease. *Rev. Neurosci.* 6:287-316
- Ohno, K., P. A. Quiram, et al.** (1997). "Congenital myasthenic syndromes due to heteroallelic nonsense/missense mutations in the acetylcholine receptor epsilon subunidad gene: identification and functional characterization of six new mutations." *Hum. Mol. Genet.* 6: 753-66
- Olale, F., Gerzanich, V., Kuryatov, A., Wang, F., Lindstrom, J.** (1997) Chronic nicotine exposure differentially addects the function of human alpha3, alpha4, and alpha7 neuronal nicotinic receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283:675-683
- Orengo, C.A., Michie, A.D., Jones, D.T., Swindells, M.B., Thornton, J.M.** (1997) CATH-a hierarchic classification of protein domain structures. *Structure* 5:1093-1108

Overington, J.P., Zhu, Z.Y., Sali, A., Johnson, M.S., Sowdhamini, R., Louie, G.V., Blundell, T.L. (1993) Molecular recognition in protein families- a database of aligned three-dimensional structures of related proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 21:597-604

Pauly, J.R., Collins, A.C. (1993) An autoradiographic analysis of alterations in nicotinic cholinergic receptors following 1 week of corticosterone supplementation. *Neuroendocrinology* 57:262-271

Pereira, E.F., Alkondon, M., Reinhardt, S., Maelicke, A., Peng, X., Lindstrom, J., Whiting, P., Albuquerque, E.X. (1994) Physostigmine and galanthamine: probes for a novel binding site on the alpha4 beta2 subtype of neuronal nicotinic acetylcholine receptors stably expressed in fibroblast cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270:768-778

Pereira, E.F., Reinhardt-Maelicke, S., Schrattenholz, A., Maelicke, A., Albuquerque, E.X. (1993) Identification and functional characterization of a new agonist site on nicotinic acetylcholine receptors of cultured hippocampal neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265:1474-1491

Perry, E. K., Tomlinson, B.E., Blessed, G., Bergmann, K., Gibson, P.H. (1978) Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *Br. Med. J.* 2:1457-1459

Perry, E.K., Morris, C.M., Court, J.A., Cheng, A., Fairbairn, A.F., McKeith, I.G., Irving, D., Brown, A., Perry, R.H. (1995) Alteration in nicotine binding sites in Parkinson's disease, Lewy body dementia and Alzheimer's disease: possible index of early neuropathology. *Neuroscience* 64:385-395

Phillips, W.D., Maimone, M.M., Merlie, J.P. (1991) Mutagenesis of the 43 kD postsynaptic protein defines domains involved in plasma membrane targeting and AChR clustering. *J. Cell. Biol.* 115:1713-1723

Picciotto, M.R., Zoli, M., Lena, C., Bessis, A., Lallemand, Y., LeNovere, N., Vincent, P., Pich, E.M., Brulet, P., Changeux, J.P. (1995) Abnormal avoidance learning in mice lacking functional high-affinity nicotine receptor in the brain. *Nature* 374:65-67

Pomerleau, O.F. (1986) Nicotine as a psychoactive drug: anxiety and pain reduction. *Psychopharmacol. Bull.* 22:865-869

Pontieri, F.E., Tanda, G., Orzi, F., di Chiara, G. (1996) Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. *Nature* 382:255-257

Pulver, A.E., Karayiorgou, M., Wolyniec, P.S., Lasseter, V.K., Kasch, L., Nestadt, G., Antonarakis, S., Housman, D., Kazazian, H.H., Meyers, D., et al. (1994) Sequential strategy to identify a susceptibility gene for schizophrenia: report of potential linkage on chromosome 22q12-q13:1: Part 1. *Am. J. Med. Genet.* 54:36-43

Rana, B., McMorn, S.O., Reeve, H. L., Wyatt, C.N., Vaughan, P.F., Peers, C. (1993) Inhibition of neuronal acetylcholine receptors by imipramine and desipramine. *Eur. J. Pharmacol.* 250:247-251

Ramarao, N.K., Cohen, J.B. (1998) Mechanism of nicotinic acetylcholine receptor cluster formation by rapsyn. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95:4007-4012

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

Reynolds, J.A., Karlin, A. (1978) Molecular weight in detergent solution of acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *Biochemistry* 17:2035-2038

- Richardson, J.S.** (1981) The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Protein. Chem.* 34:167-339
- Rish, N.** (1990) Linkage strategies for genetically complex traits. Part I: Multilocus models. *Am. J. Hum. Genet.* 46:222-228
- Robinson, S.F., Marks, M.J., Collins, A.C.** (1996) Inbred mouse strains vary in oral self-selection of nicotine. *Psychopharmacology (Berl)* 124:332-339
- Role, R.W.** (1992) Diversity in primary structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2:254-262
- Romanelli, L., Ohman, B., Adem, A., Nordberg, A.** (1988) Subchronic treatment of rats with nicotine: interconversion of nicotinic receptor subtypes in brain. *Eur. J. Pharmacol.* 148:289-291
- Rowell, P.P., Duggan, D.S.** (1998) Long-lasting inactivation of nicotinic receptor function *in vitro* by treatment with high concentration of nicotine. *Neuropharmacology* 37:103-111
- Rustet, J., Graupner, L., O'Connell, N., Nicholls, C.** (1994) Does nicotine improve cognitive function? *Psychopharmacology (Berl)* 115:547-549
- Salin-Pascual, R.J., Drucker-Colin, R.** (1998) A novel effect of nicotine on mood and sleep in major depression. *Neuroreport* 9:57-60
- Salin-Pascual, R.J., Rosas, M., Jimenez-Genchi, A., Rivera-Meza, B.L., Delgado-Parra, V.** (1996) Antidepressant effect of transdermal nicotine patches in nonsmoking patients with major depression. *J. Clin. Psychiatry* 57:387-389
- Sanberg, P.R., Fogelson, H.M., Manderscheid, P.Z., Parker, K.W., Norman, A.B., McConville, B.J.** (1988) Nicotine gum and haloperidol in Tourette's syndrome *Lancet* 1:592
- Sanberg, P.R., Silver, A.A., Shytle, R.D., Philipp, M.K., Cahill, D.W., Fogelson, H.M., McConville, B.J.** (1997) Nicotine for the treatment of Tourette's syndrome. *Pharmacol. Ther.* 74:21-25
- Sargen, P.B.** (1993) The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 16:403-443
- Scheffer, I.E., Bhatia, K.P., Lopes-Cendes, I., Fish, D.R., Marsden, C.D., Andermann, E., Andermann, F., Desbiens, R., Keene, D., Cendes, F., et al.** (1995) Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. A distinctive clinical disorder. *Brain* 118:61-73
- Schofield, G.G., Witkop, B., Warnick, J.E., Albuquerque, E.X.** (1981) Differentiation of the open and closed states of the ionic channels of nicotinic acetylcholine receptors by tricyclic antidepressants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:5240-5244
- Schrattenholz, A., Pereira, E.F., Roth, U., Weber, K.H., Albuquerque, E.X., Maelicke, A.** (1996) Agonist responses of neuronal nicotinic acetylcholine receptors are potentiated by a novel class of allosterically acting ligands. *Mol. Pharmacol.* 49:1-6
- Schwartz, R.D., Kellar, K.J.** (1985) *In vivo* regulation of [³H]acetylcholine recognition sites in brain by nicotinic cholinergic drugs. *J. Neurochem.* 45:427-433
- Semba, J., Mataka, C., Yamada, S., Nankai, M., Toru, M.** (1998) Antidepressant-like effects of chronic nicotine on learned helplessness paradigm in rats. *Biol. Psychiatry* 43:389-391
- Sibanda, B.L., Thornton, J.M.** (1985) Hairpin families in globular proteins. *Nature* 316:170-174

- Silverman**, J.M., Geenberg, D.A., Altstiel, L.D., Siever, L.J., Mohs, R.C., Smith, C.J., Zhou, G., Hollander, T.E., Yang, X.P., Kedache, M., Li, G., Zaccario, M.L., Davis, K.L. (1996) Evidence of a locus for schizophrenia and related disorders on the short arm of chromosome 5 in a large pedigree. *Am. J. Med. Genet.* 67:162-171
- Simmons**, L.K., Schuetze, S.M., Role, L.W. (1990) Substance P modulates single-channel properties of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron* 4:393-403
- Sjöberg**, S.L., Svensson, A.I., Zhang, X., Nordberg, A. (1998) Neuronal nicotinic receptor activation: a promising strategy for treatment of Alzheimer's disease? *International J. Ger. Psychopharmacol.* 1:145-149
- Siddiqui**, A.S., Barton, G.J. (1995) Continuous and discontinuous domains: an algorithm for the automatic generation of reliable protein domain definitions. *Protein Sci.* 4:872-884
- Sowdhamini**, R., Rufino, S.D., Blundell, T.L. (1996) A database of globular protein structural domains: clusterin of representative family members into similar folds. *Fold. Design.* 1:209-220
- Stage**, K.B., Glassman, A.H., Covey, L.S. (1996) Depression after smoking cessation: case reports. *J. Clin. Psychiatry* 57:467-469
- Steinlein**, O.K., Mulley, J.C., Propping, P., Wallace, R.H., Phillips, H.A., Sutherland, G.R., Scheffer, I.E., Berkovic, S.F. (1995) A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat. Genet.* 11:201-203
- Stitzel**, J.A., Farnham, D.A., Collins, A.C. (1996) Chronic corticosterone treatment elicits dose-dependent changes in mouse brain alpha-bungarotoxin binding. *Neuroscience* 72:791-799
- Storch**, A., Schratzenholz, A., Cooper, J.C., Abdel Ghani, E.M., Gutbrod, O., Weber, K.H., Reinhardt, S., Lobron, C., Hermsen, B., Soskic, V., *et al.* (1995) Physostigmine, galanthamine and codeine act as 'noncompetitive nicotinic receptor agonists' on clonal rat pheochromocytoma cells. *Eur. J. Pharmacol.* 290: 207-219
- Svensson**, A.L., Nordberg, A. (1996) Tacrine interacts with an allosteric activator site on alpha4beta2 nAChRs in M10 cells. *Neuroreport* 7:2201-2205
- Swindells**, M.B. (1995) A procedure for detecting structural domains in proteins. *Protein Sci.* 4:103-112
- Taylor**, W.R., Orengo, C.A. (1989) Protein structure alignment. *J. Mol. Biol.* 208:208-229
- Taylor**, W.R., Thornton, J.M. (1984) Recognition of super-secondary structure in proteins. *J. Mol. Biol.* 173:487-512
- Thornton**, J.M., Orengo, C.A., Todd, A.E., Pearl, F.M.G. (1999) Protein folds, functions and evolution. *J. Mol. Biol.* 293:333-342
- Tohgi**, H., Utsugisawa, K., Yoshimura, M., Nagane, Y., Milhara, M. (1998) Age-related changes in nicotinic acetylcholine receptor subunits alpha4 and beta2 messenger RNA expression in post-mortem human frontal cortex and hippocampus. *Neurosci. Lett.* 245:139-142
- Toyoshima**, C., Unwin, N. (1988) Ion channel of acetylcholine receptor reconstructed from images of postsynaptic membranes. *Nature* 336:247-250

- Toyoshima, C., Unwin, P.N.T.** (1990) Three-dimensional structure of the acetylcholine receptor by cryoelectron microscopy and helical image reconstruction. *J. Cell. Biol.* 111:2623-2635
- Tsigelny, I., N. Sugiyama, et al.** (1997). "A model of the nicotinic receptor extracellular domain based on sequence identity and residue location." *Biophys. J.* 73(1): 52-66.
- Tsuang, M.T.** (1993) Genotypes, phenotypes and the brain. A search for connections in schizophrenia. *Br. J. Psychiatry* 163:299-307
- Unwin, N.** (1995) Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature* 373:37-43
- Unwin, N.** (1993) Nicotinic acetylcholine receptor at 9Å resolution *J. Mol. Biol.* 229:1101-1124
- Valenzuela, C.F., Dowding, A.J., Arias, H.R., Johnson, D.A.** (1994) Antibody-induced conformational changes in the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor: a fluorescence study. *Biochemistry* 33:6586-6594
- Vidal, C.** (1996) Nicotinic receptors in the brain. Molecular biology, function and therapeutics. *Mol. Chem. Neurophatol.* 28:3-11
- Villarroel, A., Herlitze, S., Koenen, M., Sakmann, B.** (1991) Location of a threonine residue in the α subunidad M2 transmembrane segment that determines the ion flow through the acetylcholine receptor channel. *Proc. R. Soc. B.* 243:69-74
- Wang, F., Gerzanich, V., Wells, G.B., Anand, R., Peng, X., Keyser, K., Lindstrom, J.** (1996) Assembly of human neuronal nicotinic receptor alpha5 subunidadis with alpha3, beta2, and beta4 subunidads. *J. Biol. Chem.* 271:17656-17665
- Wang, S., Sun, C.E., Walczak, C.A., Ziegle, J.S., Kipps, B.R., Goldin, L.R., Diehl, S.R.** (1995) Evidence for a susceptibility locus for schizophrenia on chromosome 6pter-p22. *Nat. Genet.* 10:41-46
- Warpman, U., Nordberg, A.** (1995) Epibatidine and ABT 418 reveal selective losses of alpha4beta2 nicotinic receptors in Alzheimer brains. *Neuroreport* 6:2419-2423
- Weiland, S., Witzemann, V., Villarroel, A., Propping, P., Steinlein, O.** (1996) An amino acid exchange in the second transmembrane segment of a neuronal nicotinic receptor causes partial epilepsy by altering its desensitization kinetics. *FEBS Lett.* 398:91-96
- Wetlaufer, D.B.** (1973) Nucleation, rapid folding and globular intracadena regions in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:697-701
- Whitehouse, P.J., Hedreen, J.C., White, C.L.D., Price D.L.** (1983) Basal forebrain neurons in the dementia of Parkinson disease. *Ann. Neurol.* 13:243-248
- Whitehouse, P.J., Au, K.S.** (1986) Cholinergic receptors in aging and Alzheimer's disease. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 10:665-676
- Whiting, P.J., Schoepfer, R., Conroy, W.G., Gore, M.J., Keyser, K.T., Shimasaki, S., Esch, F., Lindstrom, J.M.** (1991) Expression of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in brain and retina. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 10:61-70
- Witzemann, V., H. Schwarz, et al.** (1996). "Acetylcholine receptor epsilon-subunidad deletion causes muscle weakness and atrophy in juvenile and adult mice." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(23):13286-91
- Wonnacott, S.** (1997) Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends. Neurosci.* 20:92-98

Wonnacott, S., Drasdo, A., Sanderson, E., Rowell, P. (1990) Presynaptic nicotinic receptors and the modulation of transmitter release. *Ciba Found. Symp.* 152:87-101

Yu, X. M. and Z. W. Hall (1994). "A sequence in the main cytoplasmic loop of the alpha subunidad is required for assembly of mouse muscle nicotinic acetylcholine receptor." *Neuron* 13(1): 247-55.

Zhang, C., DeLisi, C. (2001) Protein folds: molecular systematics in three dimensions. *Cell. Mol. Life Sci.* 58:72-79

A motif present in the main cytoplasmic loop of nicotinic acetylcholine receptors and catalases

Consuelo Morgado-Valle¹, Jesús García-Colunga¹, Ricardo Miledi^{1,2}
and Mauricio Díaz-Muñoz^{1*}

¹Centro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Apartado Postal 1-1141, Juriquilla, Querétaro 76001, México

²Laboratory of Cellular and Molecular Neurobiology, Department of Neurobiology and Behavior, University of California, Irvine, CA 92697-4550, USA

A motif containing five conserved amino acids (RXPXTH(X)₁₄P) was detected in 111 proteins, including 82 nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunits and 20 catalases. To explore possible functional roles of this motif in nAChRs two approaches were used: first, the motif sequences in nAChR subunits and catalases were analysed and compared; and, second, deletions in the rat $\alpha 2$ and $\beta 4$ nAChR subunits expressed in *Xenopus* oocytes were analysed. Compared to the three-dimensional structure of bovine hepatic catalase, structural coincidences were found in the motif of catalases and nAChRs. On the other hand, partial deletions of the motif in the $\alpha 2$ or $\beta 4$ subunits and injection of the mutants into oocytes was followed by a very weak expression of functional nAChRs; oocytes injected with $\alpha 2$ and $\beta 4$ subunits in which the entire motif had been deleted failed to elicit any acetylcholine currents. The results suggest that the motif may play a role in the activation of nAChRs.

Keywords: motif; nicotinic acetylcholine receptor; catalase; assembly; main cytoplasmic loop; *Xenopus* oocytes

1. INTRODUCTION

The nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) is the prototype of a superfamily of ligand-gated ion channels that includes γ -amino butyric acid (GABA) types A and ρ , glycine and serotonin type 3 receptors (Karlin & Akabas 1995; Hucho *et al.* 1996). The nAChRs are multi-subunit proteins in which five subunits are arranged to form a central ion channel; they are widely distributed throughout the peripheral and central nervous systems of both vertebrates and invertebrates. The topology of the nAChR comprises three parts (Mishina *et al.* 1985): the extracellular region that includes most of the surface of the receptor and contains the glycosylation and ligand-binding sites (Gehle & Sumikawa 1991; Nowak *et al.* 1995); four transmembrane regions, M1–M4 (Noda *et al.* 1983), with M2 being the most likely to form the ionic pore (Galzi *et al.* 1992; Lindstrom *et al.* 1998); and the intracellular regions, formed mainly by the loop connecting the M3 and M4 transmembrane segments, which is where the sites of phosphorylation and the contact with the 43 kD protein are located (Mitra *et al.* 1989; Wagner *et al.* 1991; Nishizaki & Sumikawa 1998).

An initial search for patterns of conserved amino-acid residues associated with phosphorylation sites in a set of ligand-gated receptors, including nAChRs, GABA, glycine and glutamate receptors was done using the program MOTIF (Smith *et al.* 1990). In this program, a 'pattern' is any arrangement of two or more amino acids occurring in a protein and a 'motif' is a pattern that occurs frequently within a group of proteins. A 'block' is a solid array of aligned sequence segments containing a motif. A motif common to several nAChR subunits but

not present in GABA, glycine and glutamate receptors was detected. Subsequently, the search was extended into the Swiss-Prot and Trembl Protein data banks and a total of 111 different proteins were found to contain the RXPXTH(X)₁₄P motif, conserved entirely and with no gaps.

This paper explores sequence similarities between nAChR subunits and catalases, and speculates on the possible functional roles of the motif in the rat $\alpha 2$ and $\beta 4$ nAChRs.

2. METHODS

(a) Motif quest

A FASTA search through the Swiss-Prot and Trembl data banks was made using the amino-acid pattern RXPXTH(X)₁₄P, in which the Xs represent unspecified amino acids. The same query was made in the PDBSTR database, searching for crystallized proteins containing this motif.

(b) Construction of mutated cDNAs

The cDNAs of rat $\alpha 2$ and $\beta 4$ nicotinic subunits were used as templates to delete the motif completely or partially by polymerase chain reaction (PCR) amplification (figure 1); four mutants were constructed.

(i) $\alpha 2(\Delta 332-352)$

The 21 amino acids RSPSTHNMPNWRVALLGRVP of the wild-type $\alpha 2$ subunit were deleted using the oligonucleotides 5'-GTGGTGATGACATTGAG-3' and 5'-AGGTGGCTGATGATG-3'.

(ii) $\alpha 2(\Delta 352)$

The second P of the motif in the $\alpha 2$ subunit was deleted using 5'-CACCCGGCCTAGCAG-3' and 5'-AGGTGGCTGATGATG-3'.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

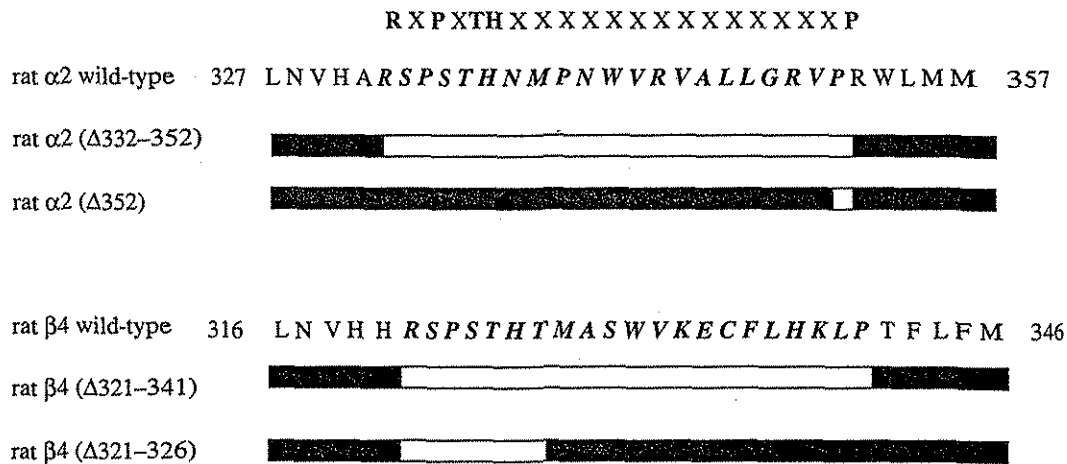


Figure 1. Amino-acid sequences of the motif and deleted regions in the $\alpha 2$ - and $\beta 4$ -subunits. Sequences are shown in the one-letter code and the white blocks show the amino acids deleted in each subunit.

(iii) $\beta 4$ ($\Delta 321-341$)

The 21 amino acids RSPSTHTMASWVKECFLHKLP of the wild-type $\beta 4$ subunit were deleted using 5'-GTGGTGCA-CATTGAGGAC-3' and 5'-ACCTTCCTCTTCATGAAG-3'.

(iv) $\beta 4$ ($\Delta 321-326$)

The six amino acids RSPSTH of the wild-type $\beta 4$ subunit were deleted using 5'-GTGGTGCACATTGAGGAC-3' and 5'-ACCATGGCATCCTGGGTC-3'.

PCR products were subcloned into pBSKS(-), using EcoRI-HindIII sites for the deleted $\alpha 2$ -subunits or EcoRI-XhoI for the deleted $\beta 4$ -subunits. Mutants identified by dideoxy sequencing were linearized with HindIII or XhoI and used as transcription templates.

(c) *In vitro* transcription and oocyte injection

In vitro transcriptions were carried out using 10 μ g of linearized DNA and the following RNA polymerases: SP6 for the wild-type $\alpha 2$ -subunit; T3 for the wild-type $\beta 4$ -subunit; and T7 for the deleted subunits, all in the presence of the cap analogue diguanosine triphosphate. Synthesized RNAs were recovered as described previously (García-Colunga & Miledi 1995) and dissolved in sterile water for injection into *Xenopus* oocytes.

The preparation of the oocytes and the injection procedures have been described previously (Kusano *et al.* 1982; Sumikawa & Miledi 1989). Briefly, *Xenopus laevis* oocytes were isolated and maintained at 16–18 °C in Barth's solution (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.33 mM Ca(NO₃)₂, 0.41 mM CaCl₂, 0.82 mM MgSO₄, 2.4 mM NaHCO₃, 5 mM HEPES; pH = 7.4) containing 0.1 mg ml⁻¹ gentamicin sulphate. The next day the oocytes were injected with 50 ng of the mixture of RNA encoding different combinations of wild-type and/or mutated $\alpha 2$ - and $\beta 4$ -subunits in a 1:1 ratio. Two days later the oocytes were treated with collagenase (140 units ml⁻¹; Sigma, St Louis, MO, USA, type I) for 15–30 min to remove the enveloping follicular cells (Miledi & Woodward 1989).

(d) *Electrophysiology*

Membrane currents were recorded three to seven days after injection using a voltage clamp technique, with two micro-electrodes filled with 3 M KCl (Miledi 1982). Individual oocytes were placed in a recording chamber (volume ca. 0.1 ml) and continuously perfused at room temperature (20–24 °C) with normal frog Ringer's solution (115 mM NaCl, 2 mM KCl,

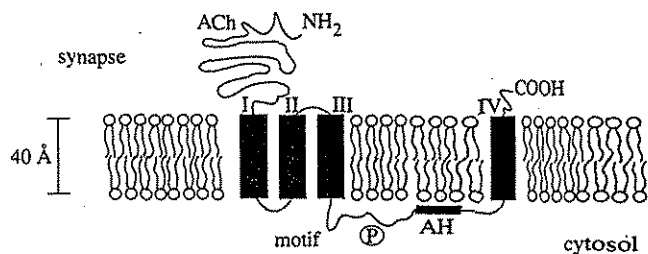


Figure 2. Putative membrane organization of an α subunit of a nicotinic acetylcholine receptor. Major features include ligand-binding (ACh) sites in the large extracellular segment, four transmembrane segments (roman numerals) and a large intracellular segment. The locations of the RXPXTH(X)₁₄P motif, the phosphorylation sites (P) and a structure known as the amphipathic helix (AH) are also shown.

1.8 mM CaCl₂, 5 mM HEPES; pH = 7.4); the test drugs were diluted in the perfusing solution and applied at a flow rate of 5–7 ml min⁻¹.

3. RESULTS

(a) *Analysis of sequences*

Our search for the motif RXPXTH(X)₁₄P in the Swiss-Prot and TrEMBL Protein Data Banks found a total of 111 different proteins containing this motif. Analyses of these sequences indicated that 82 of them corresponded to nAChR subunits, including subunits of muscle and neuronal types from different phyla (details of the sequences are shown in figure A1 in electronic Appendix A, available on The Royal Society's Web site). The RXPXTH(X)₁₄P motif was located in the M3–M4 intracellular loop, between the M3 transmembrane segment and the phosphorylation sites (figure 2).

The RXPXTH(X)₁₄P motif was also found in 20 mainly microbial and mammalian catalases, in the ribosomal protein L9 from *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis*, in the human transcriptional factor Pax-8 and in capsid proteins of the herpes virus (figure A1).

The crystallized structure of the bovine (*Bos taurus*) liver catalase, which contains the motif, was detected using the PDBSTR database. This crystal was then considered as a three-dimensional reference for the rest of

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

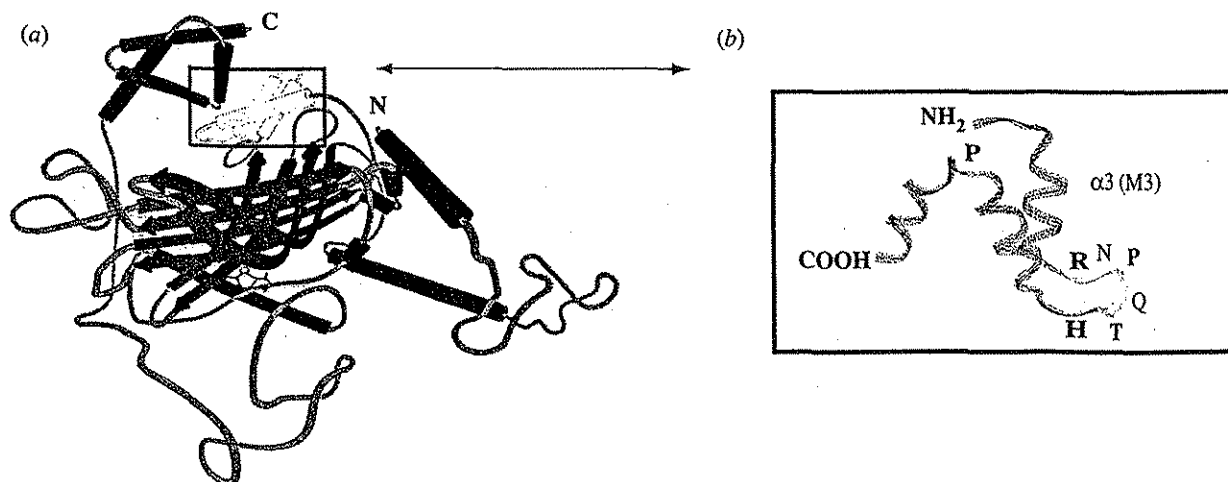


Figure 3. Three-dimensional representation of the motif in the crystallized hepatic bovine catalase. (a) Catalase monomer, α -helices are represented by cylinders and β -sheets by arrows. In the inset are the three α -helices containing the $\text{RXPXTH(X)}_{14}\text{P}$ motif. C is the carboxy and N the amino terminal of the protein. (b) Amplification of the inset showing a ribbon diagram of the section of the crystal structure of the bovine hepatic catalase containing the motif. The α -helix 3, which is equivalent to the transmembrane segment 3 (M3) in the nicotinic receptor subunits, is depicted. The amino acids forming the motif ($\text{RXPXTH(X)}_{14}\text{P}$) are shown in bold. COOH and NH_2 are the carboxy and amino extremities of the section of the protein where the motif is localized. The first four amino acids of the motif are located in the link between α -helices 3 and 4; the fifth one generates the bend that divides α -helices 4 and 5.

the proteins containing the $\text{RXPXTH(X)}_{14}\text{P}$ motif. The bovine hepatic catalase is a tetramer (57 kD per monomer) with protoporphyrin IX as a prosthetic group. Its three-dimensional structure has been resolved at 0.25 nm, allowing the identification of four domains (Murthy *et al.* 1981). The $\text{RXPXTH(X)}_{14}\text{P}$ motif is located in the second domain, between α -helices 3 and 5 (figure 3). The first four amino acids forming the motif are located in a β -turn segment connecting α -helices 3 and 4. As is usual for β -turn structures, these four amino acids are hydrophilic. The fifth amino acid of the motif, the second P, is located 14 amino acids towards the carboxy terminus, in a punctual bend of the peptide structure that separates α -helices 4 and 5 (figure 3). The amino acids in the β -turn between α -helices 3 and 4 participate in the stabilization of the quaternary structure of bovine catalase, and it appears that the first four amino acids of the $\text{RXPXTH(X)}_{14}\text{P}$ motif are engaged in protein-protein contact (Murthy *et al.* 1981). Therefore, the conserved amino acids of the $\text{RXPXTH(X)}_{14}\text{P}$ motif are found in sections that link α -helices: the first four in a β -turn connecting α -helices 3 and 4, and the fifth generating a bend in the middle of a helical segment.

(b) Effects of motif mutations on nAChR function

The possible functional role of the motif in the rat $\alpha 2$ and $\beta 4$ nAChR subunits was explored by expressing wild-type subunits in combination with deleted nAChR subunits in *Xenopus* oocytes and examining their response to acetylcholine. In non-injected oocytes no currents were elicited by either acetylcholine (100 μM) or nicotine (100 μM). Oocytes injected with a mixture of RNAs encoding the wild-type $\alpha 2$ - and $\beta 4$ -subunits responded to acetylcholine with an inward current (acetylcholine current) whose amplitude depended on the acetylcholine concentration. With 100 μM acetylcholine the mean amplitude of the current was $6.53 \pm 0.55 \mu\text{A}$ (12 oocytes,

three donors) (figure 4). In oocytes injected with RNAs encoding the $\alpha 2(\Delta 332-352)$ and wild-type $\beta 4$ -subunits, in a 1:1 ratio, no detectable membrane currents were elicited by either acetylcholine or nicotine (18 oocytes, four donors). Similar results were obtained when the $\beta 4(\Delta 321-341)$ subunit, in which the motif was totally deleted, was co-injected with the wild-type $\alpha 2$ -subunit (15 oocytes, four donors) (figure 4).

According to the crystal structure of bovine catalase, two sections can be distinguished in the segment where the motif is located: the initial four amino acids of the motif (RXPXTH) with a predicted β -turn connecting two α -helices; and the second P that confers a punctual bend within a large α -helix. Since oocytes injected with mutant $\alpha 2$ - or $\beta 4$ -subunits in which the entire motif had been deleted showed no response to acetylcholine, we decided to delete these two motif sections separately.

Deletions of the second P of the motif in the $\alpha 2$ -subunit ($\alpha 2(\Delta 352)$) and the six amino acids containing the first section of the motif in the $\beta 4$ -subunit ($\beta 4(\Delta 321-326)$) were constructed (figure 1). Oocytes injected with RNAs encoding the mutant $\alpha 2(\Delta 352)$ and the wild-type $\beta 4$ -subunits (in a 1:1 ratio) still generated acetylcholine currents, but these were much smaller than those obtained in oocytes injected with the wild-type $\alpha 2$ - and $\beta 4$ -subunits. The mean amplitude of the current elicited by 100 μM acetylcholine was $2.1 \pm 0.14 \mu\text{A}$ (ten oocytes, three donors) (figure 4).

Oocytes injected with the wild-type $\alpha 2$ - and the $\beta 4(\Delta 321-326)$ -subunits generated even smaller acetylcholine currents than oocytes expressing the $\alpha 2(\Delta 352)$ - and wild-type $\beta 4$ -receptors. The mean amplitude of the current elicited by 100 μM acetylcholine in oocytes expressing wild-type $\alpha 2$ and $\beta 4(\Delta 321-326)$ nAChRs was $29.4 \pm 7 \text{ nA}$, which represents only 0.45% of the mean acetylcholine current generated by oocytes expressing the wild-type $\alpha 2$ and $\beta 4$ nAChRs.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

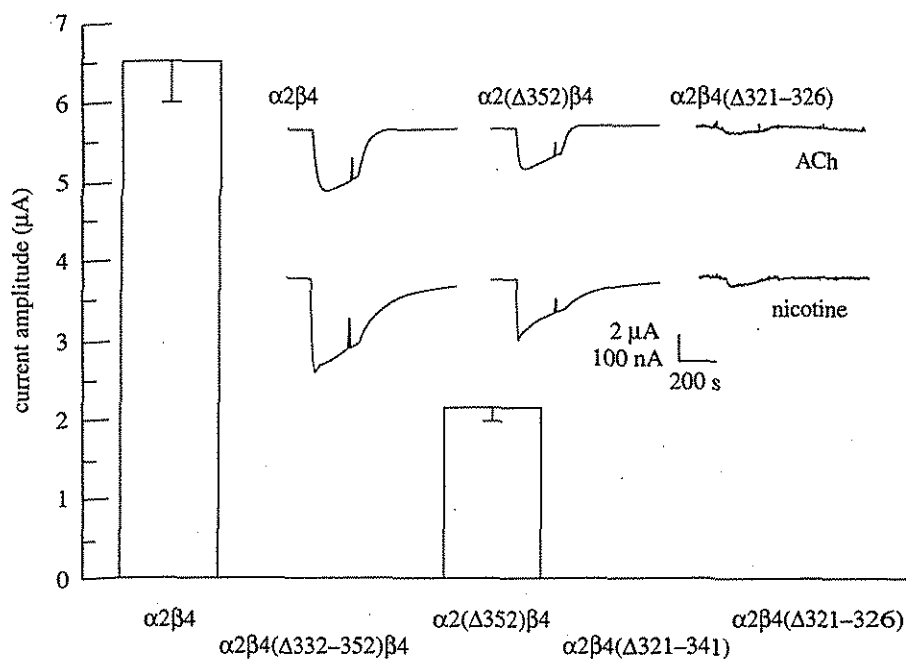


Figure 4. Currents elicited by acetylcholine in oocytes injected with wild-type or mutant nAChR subunits. (a) Columns show the mean amplitudes of the currents (\pm s.e.m.) evoked by $100 \mu\text{M}$ acetylcholine in 10–18 oocytes (three or four donors). (b) Membrane currents evoked by $100 \mu\text{M}$ acetylcholine or $100 \mu\text{M}$ nicotine in oocytes expressing wild-type or mutant nAChRs. The calibration bar represents $2 \mu\text{A}$ for the left-hand and middle traces and 100 nA for the right-hand traces. The drugs were applied during the time indicated by 10 mV pulses. The oocytes were held at -60 mV .

Sample acetylcholine currents elicited by acetylcholine and nicotine in oocytes expressing wild-type $\alpha 2$ and $\beta 4$ or mutant receptors are illustrated in figure 4. The amplitudes of the agonist-induced currents decreased in the order $\alpha 2-\beta 4 > \alpha 2(\Delta 352)-\beta 4 > \alpha 2-\beta 4(\Delta 321-326)$ and the decay of the current during prolonged applications of acetylcholine, due to nAChR desensitization, was fairly similar for all three combinations of receptors expressed. Furthermore, the currents evoked by nicotine had larger amplitudes, faster desensitizations and slower recoveries than acetylcholine currents.

Since it has been reported that a single mutation in the neuronal $\alpha 7$ nAChR converts serotonin from an antagonist into an agonist (Palma *et al.* 1996, 1997), we briefly tested some acetylcholine-receptor antagonists to explore the possibility that these drugs were acting as agonists on the mutated nAChRs. No detectable membrane currents were elicited by the nicotinic antagonists hexamethonium (1 mM), tetraethylammonium (1 mM) or (+)-tubocurarine ($100 \mu\text{M}$) on oocytes injected with any of the four mutant nAChRs.

4. DISCUSSION

Databases of protein sequences and structures have expanded rapidly and have revealed that many protein sequences adopt the same general folds. Structure determinations suggest that most of the new structures comprise motifs or domains that have been identified in other, often functionally different, proteins. This fact indicates that there is fundamental redundancy in protein structures (Sali *et al.* 1990; Sali & Kuriyan 1999). The question then arises, is it possible to infer protein structures based on the information available in sequences databases?

We detected a five-amino-acid motif in a 21-amino-acid segment of two major families of unrelated proteins: nAChRs and catalases. The motif seems to be located in regions that connect structured sections of the protein, usually α -helices, which together could form a domain. Some insight on the probable three-dimensional conformation of this segment was derived from the crystal structure of bovine hepatic catalase. Based on this, the domain would encompass a set of three α -helices, the first two being joined by a β -turn formed by six amino acids, four of which are part of the motif. The second and third α -helices are almost continuous except for a bend generated by the fifth amino acid, the second P of the motif. In nAChRs the initial section of the motif could connect two α -helices, as in the bovine catalase. These α -helices would be the one forming the M3 transmembrane region and the one situated towards the phosphorylation sites. This second α -helix would have a bend produced by the second P.

Additional coincidences augment the correspondence between the segments containing the motif in the catalase and those in the nAChR subunits:

- (i) In nAChR subunits and catalases, the NH_2 section of the motif occurs immediately after hydrophobic domains: the transmembrane segment M3 in nAChR subunits and α -helix 3 in catalases. It has been recognized that α -helix 3 is part of a 'hydrophobic channel' that allows the substrate (H_2O_2) to reach the active site of the enzyme (Murthy *et al.* 1981).
- (ii) Secondary-structure prediction programs (Chou-Fasman, MPredict) applied to nAChR subunits place the β -turn in the first four amino acids of the motif (data not shown). This coincides with the crystal

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

structure of bovine hepatic catalase (figure 3). The next section towards the carboxy terminus was considered by the prediction programs to be a structured segment, mostly α -helix. In the nAChR subunits, that segment would correspond to α -helix 4 of the bovine hepatic catalase.

- (iii) Hydrophobicity analyses indicate that the initial section of the motif, containing the β -turn, is hydrophilic in all nAChR subunits and catalases, whereas the other section of the motif, containing the second P, tends to be hydrophobic.
- (iv) The second P of the motif, which marks the junction between the fourth and fifth α -helices in bovine hepatic catalase, is 10–15 amino acids from the phosphorylation site(s) of the nAChR subunits. As a working hypothesis, the bend associated with this P may contribute to the three-dimensional arrangement required for the recognition of phosphorylation site(s) by protein kinases and phosphatases in the nAChR subunits.
- (v) As in bovine hepatic catalase, the amino acids present in the hydrophilic section of the motif in nAChR subunits could be involved in the stabilization of the quaternary structure of the protein (Yu & Hall 1994).

The cytoplasmic loop containing the motif in nAChRs is highly variable in length and sequence. Jing *et al.* (1990) reported some similarity between a motif identified in the transferrin receptor and the region of the cytoplasmic loop containing our motif. However, there were no significant similarities between the RXPXTH(X)₁₄P motif of the nAChR subunits and the transferrin-receptor motif.

Our results indicate that the motif is relevant to the functionality of the α 2- and β 4-receptors, since its complete deletion in either the α 2- or the β 4-subunit abolished the response of oocytes to cholinergic ligands. We believe that this effect depends directly on the absence of the motif, and not on the size of the deletion, because preliminary experiments in which a different sequence was inserted in place of the motif again led to non-responsive oocytes (data not shown). This suggests that the motif is necessary for the generation of acetylcholine currents.

Noda *et al.* (1983) reported the effect of several amino-acid substitutions in the α -subunit of *Torpedo californica* expressed in *Xenopus* oocytes. The substitution of the amino-acid sequence FIDTIP, which includes the second P of the motif, by RAR results in a significant decrease in acetylcholine sensitivity. We found similar results when the last P of the motif in the α 2-subunit was deleted and co-expressed with the wild-type β 4-subunit. The oocytes expressing α 2(Δ 352) and wild-type β 4-receptors generated smaller acetylcholine and nicotine currents than the oocytes injected with the wild-type subunits. A possible explanation for this effect is that the deletion affects the assembly or the properties of the receptors. Further experiments are needed to distinguish between these possibilities.

In catalases, three amino acids of the motif described here have been implicated in the contact between monomers (Murthy *et al.* 1981). Based on the three-dimensional structure of bovine catalase, the residues that form the

motif in the nAChR subunits may play important roles in nAChR assembly.

Yu & Hall (1994) reported that a sequence of 17 amino acids near the C-terminal end of the M3-M4 loop was necessary for a late step of acetylcholine-receptor assembly. They found that in a chimeric α -subunit, in which the 17-amino-acid segment was replaced with the corresponding segment of the β -subunit, the receptor-assembly pathway did not continue. Nevertheless, they detected ¹²⁵I α -bungarotoxin binding, indicating that the chimeric subunit was capable of folding correctly. They also observed in a different experiment that when a region of the α -subunit, including the motif described in this report, was replaced by its equivalent from the β subunit, the ¹²⁵I α -bungarotoxin binding in the plasma membrane of oocytes was significantly diminished with respect to the control. This result supports the hypothesis that the presence of the motif reported here is relevant to the functioning of the nAChR, and further supports a lack of appropriate assembly as the putative explanation for the decline of the currents elicited by cholinergic agonists in wild-type α 2- and β 4-receptors when the motif is deleted.

In conclusion, we detected a new motif formed by a five-amino-acid pattern in a block of 21 amino acids present in two major families of unrelated proteins: nAChRs and catalases. This motif may play an important role in determining the structure and function of nAChRs.

The initial search was made in the laboratory of Dr Mauricio Montal (University of California, San Diego). We are very grateful to Dr J. Boulter and Dr S. Heinemann (The Salk Institute) for providing the acetylcholine-receptor subunit clones. We thank Dr Lothar Kurts for help in analysing the crystal protein data bank, Dr Ataulfo Martínez for help in constructing the deleted subunits and M. Sc. Marina Herrera González for help with the *in vitro* transcriptions. This work was supported by a grant of Dirección General de Asuntos del Personal Académico IN 200398 to M.D.M. and J.G.C. and a grant from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología G25775N to R.M. and J.G.C.

REFERENCES

- Galzi, J., Devillers-Thiery, A., Hussy, N., Bertrand, S., Changeux, J. & Bertrand, D. 1992 Mutations in the channel domain of a neuronal nicotinic receptor convert ion selectivity from cationic to anionic. *Nature* **359**, 500–505.
- García-Colunga, J. & Miledi, R. 1995 Effects of serotonergic agents on neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 2919–2923.
- Gehle, V. & Sumikawa, K. 1991 Site-directed mutagenesis of the conserved N-glycosylation site on the nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Mol. Brain Res.* **11**, 17–25.
- Hucho, F., Tsetlin, V. I. & Machold, J. 1996 The emerging three-dimensional structure of a receptor. The nicotinic acetylcholine receptor. *Eur. J. Biochem.* **239**, 539–557.
- Jing, S., Spencer, T., Miller, K., Hopkins, C. & Trowbridge, I. 1990 Role of the human transferrin receptor cytoplasmic domain in endocytosis: localization of a specific signal sequence for internalization. *J. Cell Biol.* **110**, 283–294.
- Karlin, A. & Akabas, M. 1995 Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. *Neuron* **15**, 1231–1244.
- Kusano, K., Miledi, R. & Stinnakre, J. 1982 Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus* oocytes membrane. *J. Physiol. (Lond.)* **328**, 143–170.

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

- Lindstrom, J., Peng, X., Kuryatov, A., Lee, E., Anand, R., Gerzanich, V., Wang, F., Well, G. & Nelson, M. 1998 Molecular and antigenic structure of nicotinic acetylcholine receptors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **841**, 71–86.
- Miledi, R. 1982 A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond. B* **215**, 491–497.
- Miledi, R. & Woodward, R. M. 1989 Effects of defolliculation on membrane current responses of *Xenopus* oocytes. *J. Physiol. (Lond.)* **416**, 601–621.
- Mishina, M. (and 13 others) 1985 Location of functional regions of acetylcholine receptor α -subunit by site-directed mutagenesis. *Nature* **313**, 364–369.
- Mitra, A. K., McCarthy, M. P. & Stroud, R. 1989 Three-dimensional structure of the nicotinic acetylcholine receptor and location of the major associated 43-kD cytoskeletal protein, determined at 22 Å by low dose electron microscopy and X-ray diffraction to 12.5 Å. *J. Cell Biol.* **109**, 755–774.
- Murthy, M. R. N., Reid, T. J., Sicignano, A., Tanaka, N. & Rossman, M. G. 1981 Structure of beef liver catalase. *J. Mol. Biol.* **152**, 465–499.
- Nishizaki, T. & Sumikawa, K. 1998 Effects of PKC and PKA phosphorylation on desensitization of nicotinic acetylcholine receptors. *Brain Res.* **812**, 242–245.
- Noda, M. (and 10 others) 1983 Primary structures of β - and δ -subunit precursors of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequences. *Nature* **301**, 251–255.
- Nowak, M. (and 12 others) 1995 Nicotinic receptor binding site probed with unnatural amino acid incorporation in intact cells. *Science* **268**, 439–442.
- Palma, E., Mileo, A. M., Eusebi, F. & Miledi, R. 1996 Threonine-for-leucine mutation within domain M2 of the neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptor converts 5-hydroxytryptamine from antagonist to agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 11231–11235.
- Palma, E., Maggi, L., Eusebi, F. & Miledi, R. 1997 Neuronal nicotinic threonine-for-leucine 247 $\alpha 7$ mutant receptors show different gating kinetics when activated by acetylcholine or by the noncompetitive agonist 5-hydroxytryptamine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9915–9919.
- Šali, A. & Kuriyan, J. 1999 Challenges at the frontiers of structural biology. *Trends Biol. Sci.* **24**, M20–M24.
- Šali, A., Overington, J. P., Jonson, M. S. & Blundell, T. L. 1990 From comparisons of protein sequences and structures to protein modelling and design. *Trends Biol. Sci.* **15**, 235–239.
- Smith, H. O., Annau, T. & Chandrasegaran, S. 1990 Finding sequence motifs in groups of functionally related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 826–830.
- Sumikawa, K. & Miledi, R. 1989 Assembly and N-glycosylation of all ACh receptor subunits are required for their efficient insertion into plasma membranes. *Mol. Brain Res.* **5**, 183–192.
- Wagner, K., Edson, K., Heginbotham, L., Post, M., Haganir, R. & Czernik, A. 1991 Determination of the tyrosine phosphorylation sites of the nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* **266**, 23784–23789.
- Yu, M. V. & Hall, Z. W. 1994 A sequence in the main cytoplasmic loop of the α subunit is required for assembly of mouse muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* **13**, 247–255.

An electronic appendix to this paper can be found at <http://www.pubs.royalsoc.ac.uk>.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

73