



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DOCTOR EN BIOQUÍMICA

**“FARMACOLOGÍA MOLECULAR DE RECEPTORES
PENTAMÉRICOS DE NEUROTRANSMISORES”**

MARIANA BARTOS

Bahía Blanca

Argentina

2010



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DOCTOR EN BIOQUÍMICA

**“FARMACOLOGÍA MOLECULAR DE RECEPTORES
PENTAMÉRICOS DE NEUROTRANSMISORES”**

MARIANA BARTOS

Bahía Blanca

Argentina

2010

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Bioquímica, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), durante el período comprendido entre el 15 de Marzo de 2005 y el 1 de Diciembre de 2009, bajo la dirección de la Doctora Cecilia Bouzat, Investigador principal de CONICET y Profesor Adjunto de la Cátedra de Farmacología II.

AGRADECIMIENTOS

Quiero hacer extensivo mi agradecimiento a...

...la Universidad Nacional del Sur por permitirme acceder al Doctorado y a CONICET por financiar junto con la Universidad mis estudios de postgrado.

...a mi Directora Dra. Cecilia Bouzat, por darme un lugar en su laboratorio y por enseñarme a que todo se consigue con esfuerzo, estudio, perseverancia y trabajo.

... a todos mis compañeros de laboratorio, Carmen, Diego, María José, Jeremías, Natalia, Fernanda, Guillermina, Matías, Leo e Ignacio, algunos de ellos amigos, porque además de excelentes profesionales son buenas personas y eso es lo que enriquece el trabajo diario.

...a Fer Gumilar porque descubrí en ella a una persona íntegra y excepcional. Por animarme, acompañarme y ser una gran amiga.

...a todos los miembros del Instituto de Investigaciones Bioquímicas porque de alguna manera u otra me ayudaron en este recorrido.

... al excelente grupo humano de Toxicología, Alejandra, Patricia, Fernanda, Sergio, Marcelito y Sebastián. Por ser excelentes personas y darme un lugar en la Cátedra y en sus vidas.

... a mis papás, María y Alberto, a quienes les debo lo que soy, por ser ejemplos de vida y apoyarme en cada una de las decisiones que tomo, y a mis hermanos Pablo y Andrés, por estar siempre a mi lado.

...a mis suegros Graciela y Mario y a mis incondicionales amigas Andrea, Carolina, Verónica y Marielita.

...por último quiero agradecer y dedicarle esta Tesis a la persona que me acompaña diariamente en la vida, a mi amor Adrián. Por ser paciente, simple, alegre, inteligente, compañero, por hacerme reír y completar mi vida. Porque las cosas son más sencillas a su lado.

1 de Diciembre de 2009

Mariana Bartos

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el 09/04/2010,
mereciendo la calificación de 10 (Sobresaliente).

FARMACOLOGÍA MOLECULAR DE RECEPTORES PENTAMÉRICOS DE NEUROTRANSMISORES.

RESUMEN

El cerebro humano está formado por una compleja red de células nerviosas que utilizan diversas señales para comunicarse entre ellas. La propagación de señales tiene lugar en la sinapsis química en donde el neurotransmisor liberado por la neurona presináptica interacciona con un receptor postsináptico específico. Los canales iónicos activados por ligandos (LGIC) median respuestas rápidas en dichas sinapsis. El rol vital de los mismos es convertir una señal química en un impulso eléctrico. Para generar una respuesta adecuada los LGIC deben ser capaces de activarse en presencia del neurotransmisor y cerrarse en su ausencia. Estos receptores están involucrados en el aprendizaje, la memoria, el movimiento y en enfermedades genéticas, y son blancos de numerosos fármacos.

Los receptores pentaméricos Cys-loop son LGIC que intervienen en sinapsis químicas rápidas. La duración, amplitud y frecuencia de una respuesta sináptica es gobernada por la cinética de apertura, cierre y desensibilización del canal. Los mecanismos moleculares de estos procesos no se conocen todavía. Los receptores poseen un dominio extracelular, unido al neurotransmisor, y una región transmembranal, formadora del poro iónico. Uno de los objetivos de este trabajo de Tesis fue dilucidar el rol funcional de la interfase entre ambos dominios. Con este fin utilizamos receptores homopentaméricos con interfases con secuencias de $\alpha 7$ y 5-HT_{3A} en los diferentes *loops* que las componen y evaluamos los tiempos de apertura y desensibilización de los receptores formados. Esta estrategia nos permitió determinar la contribución de cada *loop* y las consecuencias funcionales de la interacción entre ellos. Determinamos que la interacción entre los distintos *loops* de la interfase permite el acoplamiento de la unión del agonista con la apertura del poro iónico y gobierna la cinética de apertura y desensibilización de los receptores Cys-loop, controlando de esta manera la duración de la respuesta sináptica y el período refractario.

Los nematodos parásitos tienen importancia médica y veterinaria ya que afectan la salud del hombre y del animal. Los fármacos antihelmínticos son esenciales para controlar los nematodos parásitos. Los agentes levamisol, pirantel, morantel y oxantel, ejercen su acción

actuando sobre los nAChRs de los helmintos. En los últimos años se ha demostrado que la acción de estos fármacos depende del subtipo de receptor nACh. Exploramos las bases estructurales de dichas diferencias estudiando cómo estos agentes activan a los receptores nACh muscular y $\alpha 7$ de mamífero utilizando la técnica electrofisiológica de *Patch-clamp*. Encontramos que todas estas drogas son agonistas débiles del receptor nACh muscular adulto de mamífero. Por el contrario, pirantel y morantel cambian su comportamiento a agonistas completos y más potentes que la ACh en el receptor $\alpha 7$. Determinamos que la posición 57, localizada en el lado complementario del sitio de unión de agonistas, es responsable de la diferente activación de los receptores nACh muscular y $\alpha 7$ por morantel y pirantel. Esta posición no altera la activación de ACh o de los fármacos oxantel y levamisol. El conocimiento de la activación de los nAChRs por antihelmínticos contribuirá al diseño de terapias más selectivas contra los parásitos y a comprender como éstos desarrollan resistencia a estos fármacos.

MOLECULAR PHARMACOLOGY OF PENTAMERIC RECEPTORS ACTIVATED BY NEUROTRANSMITTERS

SUMMARY

The human brain is a vast and complicated network, where billions of nerve cells use signals to communicate with each other. At chemical synapses, neurotransmitters are released from the presynaptic cell. They interact with ligand-gated ion channels (LGIC) at the postsynaptic cell that convert signals from chemical to electrical in less than one millisecond. The channels close as the neurotransmitter dissociates to terminate the synaptic event. These receptors are involved in learning, memory, movement and disease processes, and are targets for clinically relevant drugs.

The pentameric Cys-loop receptors are LGIC involved in fast chemical synapsis. Following the neurotransmitter release and binding to Cys-loop receptors, the post-synaptic response is governed by the kinetics of channel activation, deactivation and desensitization. The molecular mechanisms of these processes are still unknown. Cys-loop receptors have an extracellular domain, which contains the agonist binding sites, and a transmembrane domain where the ion pore is located. One of the goals of this Thesis was to determine the functional role of the interfacial region between extracellular and transmembrane domains. We generated homomeric chimeric receptors carrying sequences of $\alpha 7$ or 5-HT_{3A} at the different loops of the interface and evaluated the open channel lifetime and rate of desensitization. This strategy allowed us to determine the functional contribution of each loop and the consequences of structural mismatching among them. We concluded that the network of loops at the binding-pore interface of homomeric receptors is essential for coupling agonist binding to channel opening and also for dictating the kinetics of gating and desensitization. Thus, this region controls the duration of the refractory period and the synaptic response.

Parasitic nematodes are of medical and veterinary importance, affecting human and animal health. Anthelmintic drugs are essential to control nematode parasites. These agents, such as levamisol, pyrantel, morantel and oxantel, exert their action at nAChRs in nerve and muscle of nematodes. In the last years, it has been demonstrated that the actions of these drugs depend on nAChR subtypes. To understand the structural basis of the differential

activation of anthelmintics among nAChR subtypes, we studied the activation of mammalian muscle and $\alpha 7$ nAChRs by these agents at the single-channel and macroscopic-current levels. We showed that anthelminthic agents are low efficacious agonists of mammalian muscle AChRs. By contrast, morantel and pyrantel are high-efficacious and more potent agonists than ACh of $\alpha 7$ receptor. Also, we determined that position 57, located at the complementary face of the binding site, is a main determinant of the differential activation of mammalian muscle and $\alpha 7$ nAChRs by morantel and pyrantel. This position is not involved in ACh, oxantel or levamisol activation. These results provide new information for further progress in drug design and help to understand how parasites develop resistance to these drugs.

ÍNDICE

RESUMEN	I
SUMMARY	III
INTRODUCCIÓN.....	2
1- EL SISTEMA NERVIOSO	2
1.1 La Sinapsis	2
1.2 Los Neurotransmisores.....	3
1.3 Los Receptores Postsinápticos	4
2- CANALES IONICOS ACTIVADOS POR LIGANDOS.....	5
2.1 ASPECTOS GENERALES.....	6
2.1.1 Receptores Cys-loop.....	6
2.1.2 Receptor nicotínico de ACh	7
2.1.3 Evolución del conocimiento de la estructura del nAChR.....	7
2.2 ASPECTOS ESTRUCTURALES.....	9
2.2.1 Dominio extracelular y sitio de unión de agonistas.....	10
2.2.2 Dominio transmembrana y poro iónico.....	12
2.2.3 Dominio intracelular.....	13
2.3 ASPECTOS FUNCIONALES	14
2.3.1 Cambios conformacionales inducidos por el agonista	14
Etapa I: Unión del agonista	14
Etapa II: Función de la interfase entre los dominios extracelular y transmembrana.....	15
Etapa III: Apertura del poro	16
2.3.2 Estados funcionales	17
2.3.3 Subtipos de receptores nACh	20
Receptor nACh muscular	20
Receptores nACh neuronales	21
3- MODULACIÓN FARMACOLÓGICA	22
3.1 Agonistas completos y parciales	23
3.2 Antagonistas competitivos	23
3.3 Inhibidores no competitivos: Bloqueadores de canal abierto.....	24
4- ACCIÓN DE LOS ANTIHELMÍNTICOS SOBRE LOS nAChRs.....	25
METODOLOGÍA	28
1- SUBUNIDADES SALVAJES, MUTADAS Y QUIMÉRICAS	28

2- EXPRESIÓN DE RECEPTORES	28
3- ESTUDIOS ELECTROFISIOLÓGICOS	29
3.1 Equipo y pipetas	30
3.2 Registros de canal único: Configuración <i>cell-attached</i>	32
3.2.1 Soluciones	32
3.2.2 Drogas utilizadas	32
3.2.3 Registros y análisis de corrientes unitarias.....	32
3.2.4 Análisis cinético	33
3.3 Registro de corrientes macroscópicas: Configuraciones <i>outside-out</i> y <i>whole-cell</i>	34
3.3.1 Solución intracelular (ICS).....	34
3.3.2 Solución extracelular (ECS).....	34
3.3.3 Drogas utilizadas	34
3.3.4 Registro y análisis de corrientes macroscópicas	35
4- ESTUDIOS DE <i>DOCKING</i>	36
CAPÍTULO I	38
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	38
RESULTADOS.....	40
1- ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR nACh MUSCULAR ADULTO POR MORANTEL Y OXANTEL	40
1.1 Efecto de morantel y oxantel sobre corrientes de canal único del nAChR muscular de mamífero	41
1.2 Bloqueo de canal abierto del receptor nACh muscular por morantel y oxantel.....	42
1.3 Corrientes macroscópicas del nAChR muscular adulto activadas por morantel y oxantel	43
2- ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS ANTIHELMÍNTICOS SOBRE EL RECEPTOR $\alpha 7$ NEURONAL	44
2.1 Corrientes unitarias del receptor nACh $\alpha 7$ activadas por agentes antihelmínticos	44
2.2 Bloqueo del poro del receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT _{3A} por drogas antihelmínticas	46
2.3 Efecto de las drogas antiparasitarias sobre las corrientes macroscópicas de $\alpha 7$	49
2.4 Análisis cinético del receptor $\alpha 7$ activado por pirantel	51
3- RESIDUOS INVOLUCRADOS EN LA ACTIVACIÓN DIFERENCIAL DE SUBTIPOS DE nAChRs POR PIRANTEL Y MORANTEL	56
3.1 El sitio de unión de agonistas	56
3.2 Residuos del lado complementario involucrados en la unión de fármacos antihelmínticos ...	57
i) Estudio de los residuos del lado complementario del receptor nACh $\alpha 7$	57
ii) Análisis cinético del receptor nACh $\alpha 7$ portando la mutación Q57G	62
iii) Estudio de residuos del lado complementario del receptor nACh muscular	63

3.3 Residuos del lado principal que participan de la unión de las drogas antiparasitarias	66
3.4 Análisis a nivel de canal único del receptor portando mutaciones en el lado principal y complementario	67
DISCUSIÓN.....	68
Acción de los antihelmínticos sobre el receptor nACh muscular adulto de mamífero	69
Efecto de los fármacos antihelmínticos sobre el receptor nACh $\alpha 7$	70
Cinética de activación del receptor $\alpha 7$ -5HT _{3A} por pirantel	71
Bases estructurales de la alta selectividad de pirantel y morantel por $\alpha 7$	72
Estudios <i>in silico</i>	75
Sensibilidad y resistencia a los fármacos antihelmínticos.....	79
Conclusiones finales.....	80
CONCLUSIONES FINALES DEL CAPÍTULO I	81
CAPÍTULO II.....	83
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	83
RESULTADOS	85
1- PROPIEDADES FUNCIONALES DE RECEPTORES HOMOPENTAMÉRICOS.....	85
1.1 Receptor nACh $\alpha 7$	85
i) Corrientes unitarias y macroscópicas de $\alpha 7$ activadas por ACh	85
ii) Análisis cinético del receptor nACh $\alpha 7$	89
iii) Recuperación de la desensibilización del receptor nACh $\alpha 7$	90
1.2 Receptor de 5-HT _{3A}	91
2- ROL DE LA INTERFASE ENTRE LOS DOMINIOS EXTRACELULAR Y TRANSMEMBRANA	94
2.1 Interfase mixta conteniendo residuos de $\alpha 7$ y 5-HT _{3A}	95
2.2 Conversión de una interfase mixta en homogénea	96
i) Receptor con interfase $\alpha 7$ (<i>all-$\alpha 7$</i>)	97
ii) Receptor con interfase 5-HT _{3A} (<i>all-5HT_{3A}</i>)	98
iii) Cinética de los receptores homopentaméricos nativos y quiméricos.....	100
3- CONTRIBUCIÓN DE LOS DIFERENTES <i>LOOPS</i> DE LA INTERFASE	102
3.1 <i>Loops</i> del dominio extracelular: Rol de los <i>loops</i> Cys- y $\beta 8\beta 9$	102
i) Contribución del Cys-loop.....	102
ii) Contribución del <i>loop</i> $\beta 8\beta 9$	103
3.2 <i>Loops</i> del dominio transmembrana: Rol de M1 y M2M3	104
i) Secuencias de $\alpha 7$ en M1 y de 5-HT _{3A} en M2M3	104
ii) Secuencias de 5-HT _{3A} en M1 y de $\alpha 7$ en M2M3	106

iii) Secuencias de $\alpha 7$ en M1 y M2M3	107
DISCUSIÓN	108
Activación y desensibilización en presencia de interfases con secuencias mixtas y homogéneas	109
Función de los distintos <i>loops</i> que componen la interfase	111
i) <i>Loops</i> del dominio extracelular: Rol de los <i>loops</i> Cys- y $\beta 8\beta 9$	112
ii) <i>Loops</i> del dominio transmembrana: Rol de M1 y M2M3.....	113
Conclusiones finales.....	114
CONCLUSIONES FINALES DEL CAPÍTULO II	116
BIBLIOGRAFÍA	119
ABREVIATURAS	132
PUBLICACIONES	136

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1- EL SISTEMA NERVIOSO

El sistema nervioso es uno de los sistemas más complejos del cuerpo humano constituido por millones de células neuronales y glias. La comunicación entre estas células requiere un mecanismo altamente eficiente que se logra a través de contactos funcionales conocidos como sinapsis.

El científico español Santiago Ramón y Cajal obtuvo el premio Nobel de Medicina en 1906 por descubrir los mecanismos que gobiernan la morfología y los procesos conectivos de las células nerviosas. Esta teoría basada en la composición del tejido cerebral por entidades separadas comunicadas entre sí por contactos especializados revolucionó la neurociencia moderna. En la década de 1950, la microscopía electrónica biológica estableció, más allá de cualquier duda, que las células nerviosas son unidades funcionales independientes.

1.1 La Sinapsis

El sistema nervioso está formado por una compleja red de células altamente especializadas capaces de conducir la información hacia cualquier parte del cuerpo. Esta comunicación se logra a través de la sinapsis, que son contactos funcionales entre neuronas. Existen dos tipos principales de sinapsis: eléctricas y químicas. Las sinapsis eléctricas, minoritarias, permiten el flujo pasivo directo de corriente eléctrica a través de uniones en hendidura (*gap junction*), formadas por canales apareados y alineados con precisión en la membrana de cada neurona. Estos canales constituyen poros por donde circulan iones y metabolitos intracelulares. Las sinapsis químicas (Fig. 1) componen la mayoría y permiten la comunicación a través de la liberación de neurotransmisores que interactúan con receptores postsinápticos específicos.

En las sinapsis químicas no hay continuidad intercelular, la separación entre las neuronas pre- y post-sinápticas se conoce como **hendidura sináptica**. Además de la presencia de señales químicas, **neurotransmisores**, contenidas en vesículas y secretadas desde la neurona presináptica, existen **receptores** especializados en las neuronas postsinápticas que responden a ellos.

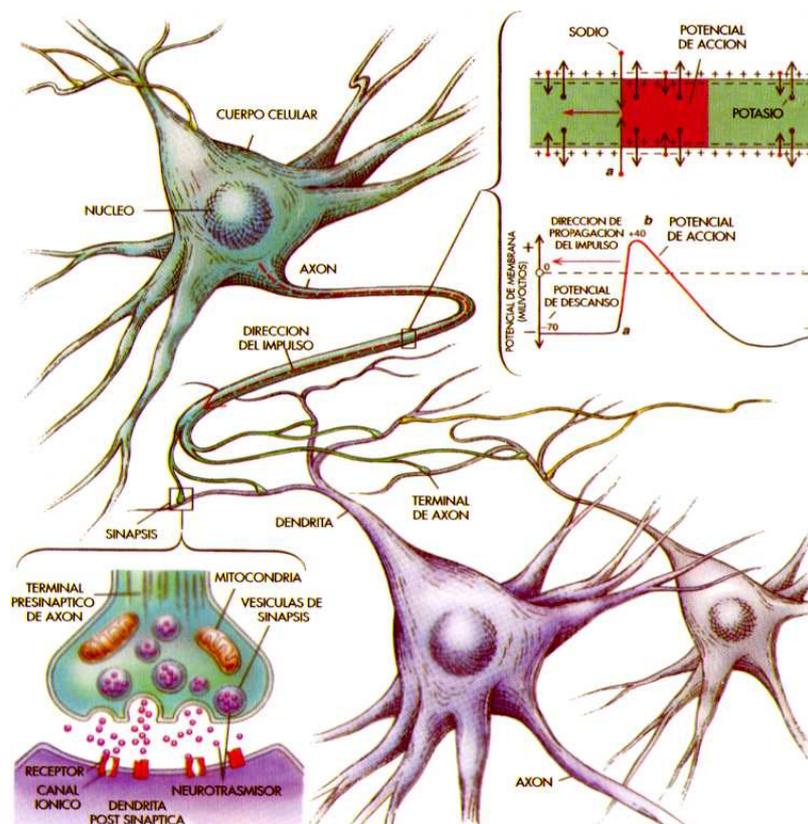


Fig. 1: Esquema de una sinapsis química entre dos neuronas.

El cambio en el potencial de membrana, asociado con la llegada del potencial de acción, produce la apertura de los canales de calcio regulados por voltaje en la membrana presináptica. La apertura de estos canales produce un influjo rápido de calcio en la terminación presináptica. El aumento en la concentración de calcio permite que las vesículas sinápticas se fusionen con la membrana plasmática liberando su contenido a la hendidura sináptica mediante un proceso calcio-dependiente. El neurotransmisor liberado difunde por este espacio hasta unirse a receptores específicos. Dependiendo del tipo de receptor se produce un flujo de corriente que altera el potencial de membrana de la neurona postsináptica, aumentando o disminuyendo la probabilidad de que se genere un potencial de acción.

1.2 Los Neurotransmisores

Los neurotransmisores son señales químicas liberadas por las terminales nerviosas presinápticas en la hendidura, capaces de interactuar con receptores postsinápticos

específicos. La unión con el receptor modifica de forma transitoria las propiedades eléctricas de la célula blanco.

En general, los neurotransmisores son sintetizados a partir de precursores definidos por vías enzimáticas reguladas y empaquetados en vesículas en la célula postsináptica; son liberadas mediante un proceso calcio-dependiente y se unen a receptores específicos; y finalmente son rápidamente eliminados o degradados a metabolitos que son recaptados nuevamente por la neurona presináptica para participar de un nuevo ciclo.

Existen numerosos neurotransmisores clasificados en neuropéptidos de gran tamaño y de molécula pequeña. Dentro de esta categoría, tenemos a las monoaminas o aminas biógenas (dopamina, noradrenalina, adrenalina, serotonina e histamina), ésteres (ACh), aminoácidos (glutamato, glicina, GABA, aspartato), purinas (ATP, GTP), prostaglandinas y gases (óxido nítrico, monóxido de carbono).

El neurotransmisor de interés en este trabajo de Tesis es la acetilcolina (ACh). La ACh es el neurotransmisor de las uniones neuromusculares, interviene en las sinapsis de los ganglios simpáticos y parasimpáticos del sistema nervioso autónomo periférico y de numerosos sitios del sistema nervioso central. La ACh es sintetizada en las terminales nerviosas a partir de acetil coenzima A (acetil CoA) y colina, por acción de la colina acetiltransferasa (CAT). A diferencia de otros neurotransmisores que son recaptados, la ACh es hidrolizada por la acetilcolinesterasa (AChE) en acetato y colina. Las terminaciones nerviosas colinérgicas contienen un transportador Na^+ -dependiente de alta afinidad que capta la colina generada de la hidrólisis de ACh.

1.3 Los Receptores Postsinápticos

Los neurotransmisores generan respuestas postsinápticas específicas luego de la unión a determinados receptores de neurotransmisores ubicados en la membrana de la neurona postsináptica. Estos receptores son proteínas integrales de membrana que poseen un dominio que une neurotransmisor. Existen de dos tipos, los metabotrópicos, que producen efectos postsinápticos más lentos, y los ionotrópicos que son canales iónicos regulados por ligando que dan origen a respuestas postsinápticas rápidas. Los receptores metabotrópicos o receptores acoplados a proteína G, no poseen canales iónicos como parte de su estructura, pero modulan indirectamente a estos al activar una o más proteínas efectoras. Los receptores ionotrópicos presentan un dominio que une neurotransmisor y otro que forma un canal iónico. Pueden producir potenciales postsinápticos excitatorios o inhibitorios, dependiendo de la

selectividad del canal a cationes o a aniones, los primeros producen despolarización y los segundos hiperpolarización de la neurona.

2- CANALES IONICOS ACTIVADOS POR LIGANDOS

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana que permiten el paso de iones de manera selectiva frente a un estímulo. Se localizan en células excitables, como células nerviosas y musculares, y no excitables como células del sistema digestivo, circulatorio, entre otras. Los canales iónicos activados por ligandos (LGIC) adquieren diferentes conformaciones y responden rápidamente a los neurotransmisores y diversos ligandos.

Existen tres diferentes superfamilias de canales iónicos activados por ligandos (Fig. 2) que comprenden a:

- Canales gatillados por ATP (receptores P2X) formados por tres subunidades homólogas, cada una con dos segmentos transmembrana separados por un dominio extracelular.
- Canales activados por Glutamato (receptores NMDA, AMPA y kainato) constituídos por cuatro subunidades homólogas. Cada subunidad está formada por tres segmentos transmembrana.
- Receptores Cys-loop (incluyen en vertebrados a los receptores: nACh, 5-HT_{3A}, GABA_A y GABA_C y de Glicina) formados por cinco subunidades homólogas con cuatro segmentos transmembrana cada una.

En los últimos años se han descubierto nuevos receptores y se han identificado las subunidades que los componen. Por tal motivo el comité de nomenclatura de la Unión Internacional de Farmacología Básica y Clínica (NC-IUPHAR) ha establecido reglas para unificar el criterio de cómo nombrarlas (Collingridge et al., 2009).

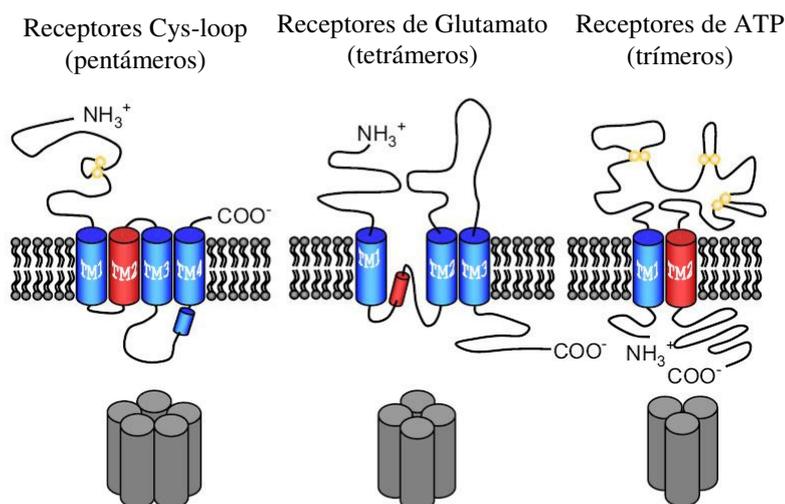


Fig. 2: Canales iónicos activados por ligandos (LGIC). Esta superfamilia está formada por los receptores Cys-loop (pentámeros), los activados por Glutamato (tetrámeros) y los gatillados por ATP (trímeros).

2.1 ASPECTOS GENERALES

2.1.1 Receptores Cys-loop

Los miembros de la familia de receptores Cys-loop son canales iónicos activados por ligandos que tienen en común en su dominio extracelular un puente disulfuro entre dos residuos de cisteína separados por 13 aminoácidos, lo que da el nombre a la familia. Están formados por cinco subunidades homólogas, cada una de las cuales contiene un extremo -NH_2 extracelular, cuatro segmentos transmembranales, un gran *loop* intracelular, y un extremo -COOH extracelular corto (Fig. 2). Estos receptores intervienen en procesos fisiológicos tales como aprendizaje y memoria, se asocian a enfermedades, y son blancos de numerosos fármacos.

Los receptores Cys-loop se clasifican en canales selectivos a cationes (excitatorios, producen despolarización de la membrana) o a aniones (inhibitorios, generan hiperpolarización de la célula). En los vertebrados encontramos en el primer grupo a receptores activados por acetilcolina (ACh; receptores nicotínicos de ACh), serotonina (5-hidroxi-triptamina o 5-HT; receptor de 5-HT₃), y en el segundo, a los activados por GABA (ácido γ -aminobutírico; receptores de GABA_A y GABA_C) y glicina (receptores de glicina). En los invertebrados esta clasificación también incluye a receptores de GABA catiónicos (Beg and Jorgensen, 2003) y a de ACh, serotonina, glutamato, histamina y aminas biógenas,

aniónicos (Vassilatis et al., 1997; Zheng et al., 2002; Putrenko et al., 2005; Wolstenholme and Rogers, 2005; Jones and Sattelle, 2008; Ringstad et al., 2009).

2.1.2 Receptor nicotínico de ACh

Dentro de los Cys-loop, el receptor nicotínico de acetilcolina (receptor nACh o nAChR) ha sido el más estudiado y es considerado modelo de toda la familia. Está presente en el sistema nervioso periférico (placa neuromuscular y sistema nervioso autónomo) y central. El nAChR está involucrado en varias funciones centrales, entre las cuales se incluyen: control voluntario del movimiento, memoria y atención, sueño y alerta, dolor y ansiedad (Le Novere N. et al., 2002; Kalamida et al., 2007), y en determinados desordenes neurológicos y psiquiátricos como la enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia, déficit de atención, etc. (Kalamida et al., 2007; Faghih et al., 2007; Bertrand and Gopalakrishnan, 2007; Bartos et al., 2009a).

Los primeros estudios fueron realizados a partir del órgano eléctrico de la raya marina *Torpedo californica* que produce una descarga eléctrica para huir de sus presas y expresa grandes densidades de nAChR (Kistler and Stroud, 1981). Luego, fueron favorecidos por el descubrimiento de la α -bungarotoxina, un componente del veneno de la serpiente *Bungarus multicinctus*, que se une de forma casi irreversible al nAChR muscular produciendo parálisis (Barnard et al., 1977; Albuquerque et al., 2009).

2.1.3 Evolución del conocimiento de la estructura del nAChR

Durante los últimos años se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de la estructura de los receptores nACh mediante la determinación:

(a) de la estructura molecular de la proteína unidora de ACh (AChBP) de caracol de agua dulce mediante la cristalización de rayos X. La primera estructura determinada fue la del molusco *Lymnaea stagnalis* resuelta a 2.7 Å (Brejc et al., 2001). Esta proteína carece del dominio transmembrana formador del poro iónico (Fig. 3). La secuencia de la AChBP tiene alta homología con la del dominio extracelular de los receptores nACh.

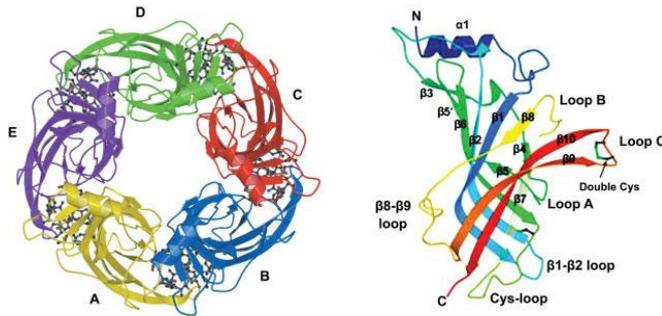


Fig. 3: Proteína unidora de ACh (AChBP) de *Lymnaea stagnalis*. Izquierda: Vista superior del pentámero. Derecha: Vista lateral de un monómero (Brejc et al., 2001).

(b) del modelo estructural completo del receptor nACh de *Torpedo* resuelto mediante microscopía electrónica probablemente en el estado cerrado (4 Å de resolución) (Unwin, 2005). Este modelo muestra los dominios extracelular y transmembrana de las distintas subunidades que componen el pentámero (Fig. 4).

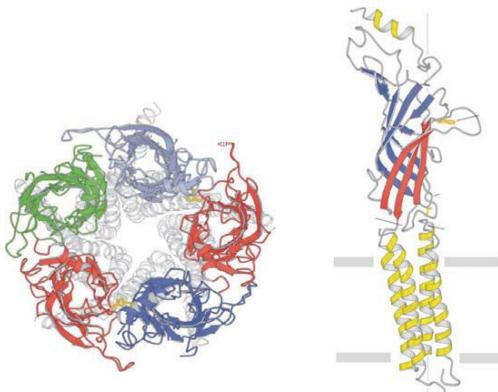


Fig. 4: Receptor nACh de *Torpedo*. Izquierda: Vista superior del receptor. Derecha: Estructura de una subunidad (Unwin et al., 2005).

(c) de la estructura del dominio extracelular de la subunidad $\alpha 1$ de ratón determinada mediante la cristalización en rayos X a 1.94 Å de resolución (Dellisanti et al., 2007). Esta es la primera estructura del receptor nACh mostrada de mamíferos. Se resolvió únicamente el dominio extracelular. Éste contiene una cadena carbonada que participa directamente de la unión de la α -bungarotoxina y un dominio hidrofílico con moléculas de agua (Dellisanti et al., 2007).

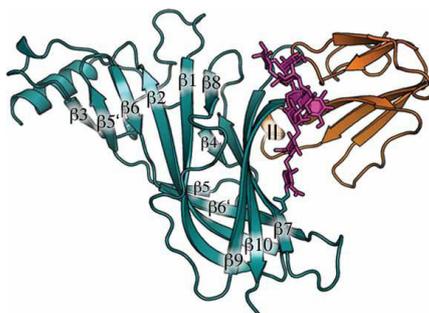


Fig. 5: Dominio extracelular de la subunidad $\alpha 1$ de ratón (Dellisanti et al., 2007).

(d) y de las estructuras cristalizadas de dos receptores procariotas pertenecientes a la familia de los canales iónicos activados por ligandos, una de la bacteria *Erwinia chrysanthemi* (proteína ELIC) resuelta a 3.3 Å probablemente en el estado cerrado (Fig. 6) (Hilf and Dutzler, 2008); y otra de la bacteria *Gleobacter violaceus* (proteína GLIC) resuelta a 3.1 Å en pH ácido probablemente en el estado abierto (Fig. 6) (Hilf and Dutzler, 2009b). Estos canales iónicos activados por protones son considerados de la familia aunque carecen del Cys-loop característico, de la α -hélice amino terminal, y del gran *loop* M3M4 citoplasmático encontrado en los receptores Cys-loop (Bocquet et al., 2007; Chang et al., 2009).

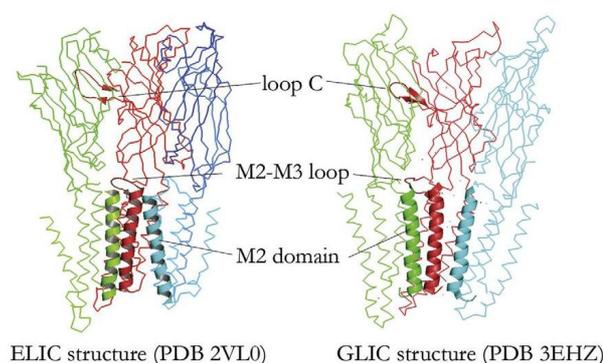


Fig. 6: Estructura molecular de los canales iónicos activados por ligandos de las bacterias ELIC (izquierda) y GLIC (derecha) (Tsetlin and Hucho, 2009).

Estos modelos han aportado información para el estudio de los mecanismos y residuos claves involucrados en el funcionamiento del receptor (Wells, 2008; Zouridakis et al., 2009; Tsetlin and Hucho, 2009; Chang et al., 2009). Sin embargo, se necesitan nuevos estudios para resolver a nivel atómico la estructura completa de los receptores nACh.

2.2 ASPECTOS ESTRUCTURALES

Numerosos estudios genéticos, proteicos, inmunológicos, microscópicos y funcionales aportaron importante información sobre los nAChRs. Estos consisten en estructuras pentaméricas formadas por subunidades que se ubican de manera tal que forman un poro iónico central. Mediante microscopía electrónica la estructura del receptor se resuelve como un cilindro que atraviesa la membrana en forma perpendicular de ~8 nm de diámetro y ~16 nm de alto (Albuquerque et al., 2009).

En los mamíferos existen 17 subunidades nicotínicas (α 1- α 10, β 1- β 4, γ , δ y ϵ) con una estructura terciaria en común. Todas las subunidades comparten (Fig. 7): 1) un dominio NH₂-terminal conservado ubicado por fuera de la célula, de aproximadamente 200 aminoácidos; 2)

cuatro dominios transmembranales también conservados, M1-M4 (de 15-20 residuos de largo cada uno); 3) un *loop* citoplasmático entre los segmentos M3 y M4 de tamaño y secuencia aminoacídica variables (110-270 residuos); y 4) una secuencia COOH-terminal relativamente corta de longitud variable (4-28 aminoácidos).

Los receptores nicotínicos formados a partir de cinco copias iguales o diferentes de subunidades presentan un dominio extracelular con sitios de unión de agonistas y un dominio transmembrana que forma un poro iónico y contiene al filtro de selectividad y la compuerta del canal.

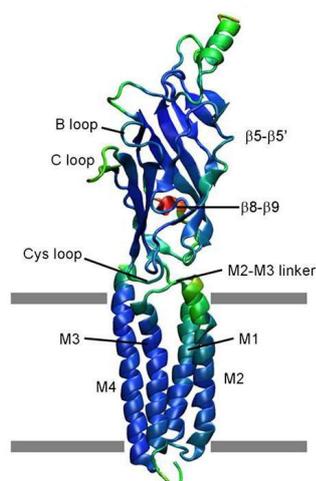


Fig. 7: Estructura de un monómero del nAChR de *Torpedo*. (Cheng et al., 2007).

2.2.1 Dominio extracelular y sitio de unión de agonistas

El dominio extracelular de cada subunidad está compuesto por un pequeño segmento α -hélice N-terminal, 2 hélices α 310 cortas, y 10 hojas plegadas β que forman una estructura β -sandwich (Fig. 7). Las hojas β se dividen en internas, formadas por β 1, β 2, β 3, β 5, β 6 y β 8, y externas compuestas de β 4, β 7, β 9 y β 10. El extremo N-terminal se encuentra en el extremo superior y el C-terminal, en el extremo inferior del dominio extracelular. El *loop* que conecta las hojas plegadas β 6 y β 7, a través de un puente disulfuro separado por 13 aminoácidos, recibe el nombre de Cys-loop.

El sitio de unión de agonistas se encuentra ubicado a 40 Å de distancia de la superficie de la membrana en la interfase de dos subunidades adyacentes. Un lado, conocido como “principal”, contribuye con 3 *loops* de hojas plegadas β que contienen principalmente residuos aromáticos: *loop* A (β 4 β 5), *loop* B (β 7 β 8) y *loop* C (β 9 β 10). Este lado proviene de subunidades α (α 1, α 2, α 3, α 4, α 6, α 7 o α 9). El lado opuesto, se conoce como “complementario” y está formado por tres porciones de hojas plegadas que reciben también

el nombre de *loop* D-F. Es aportado por subunidades α , en receptores homopentaméricos, o no- α , en heteropentámeros.

El lado principal del sitio de unión de agonistas (Fig. 8) está formado por diversos residuos aromáticos altamente conservados: Trp86 y Tyr93 (*loop* A), Trp149 y Gly153 (*loop* B), y Tyr190, Cys192, Cys193 y Tyr198 (*loop* C) (residuos correspondientes a la subunidad α de *Torpedo*). Los residuos del lado complementario son: Trp55 y Asp57 (*loop* D), Leu109, Arg111, Thr117 y Leu119 (*loop* E), y Asp174 y Glu176 (*loop* F) (residuos de las subunidades δ o γ de *Torpedo*) (Brejc et al., 2001; Changeux and Edelstein, 2001; Sine, 2002; Changeux and Taly, 2008).

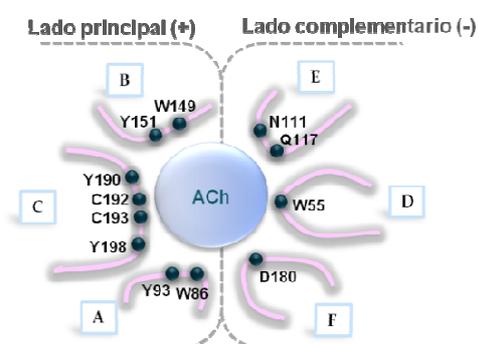


Fig. 8: Sitio de unión de agonistas formado por diferentes residuos del lado principal y complementario.

Las subunidades de los receptores nACh se clasifican como α o no- α (Fig. 9) de acuerdo a la presencia o ausencia de un par de cisteínas adyacentes del sitio de unión (residuos C192-C193 en la subunidad $\alpha 1$ de *Torpedo*) necesarias para la unión del agonista (Karlín et al., 1986; Lukas et al., 1999; Matsuda et al., 2005).

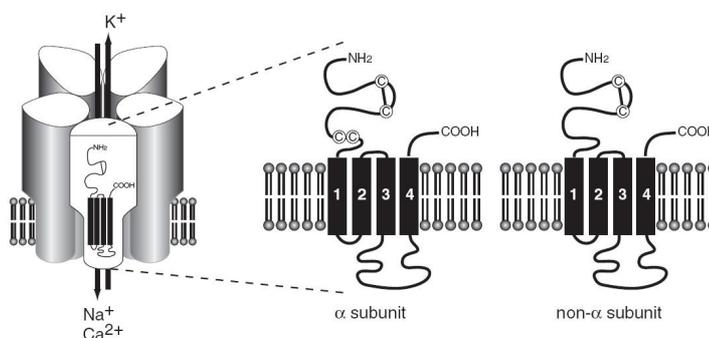


Fig. 9: Representación esquemática de subunidades α y no- α . (Matsuda et al., 2005).

En el dominio extracelular de los nAChRs existen de dos a cinco sitios de unión de agonistas. Un receptor heteropentamérico (como el nAChR muscular) contiene sólo dos sitios de unión de agonistas. En cambio, un receptor homopentamérico presenta cinco sitios de unión. Resultados de nuestro laboratorio revelaron que, aunque con dos sitios ocupados el receptor homopentamérico logra abrirse, la óptima activación se logra cuando existe tres sitios de unión no consecutivos ocupados por el agonista (Rayes et al., 2009).

2.2.2 Dominio transmembrana y poro iónico

El dominio transmembrana de los receptores nACh está formado por las cuatro hélices α de cada subunidad. Cada subunidad presenta cuatro segmentos (M1-M4) que atraviesan la membrana, conectados por medio de loops (M1M2 y M3M4 intracelulares y M2M3 extracelular). Estos segmentos se acomodan simétricamente formando el poro del canal por donde pasan los iones (Fig. 10). Los segmentos M2 forman un anillo interno y son las paredes del canal. El resto de los segmentos (M1, M3 y M4) forman un anillo externo que está en contacto con la capa lipídica. Cerca de un 25% de cada hélice se extiende por fuera de la membrana hacia el espacio extracelular (Unwin, 2005).

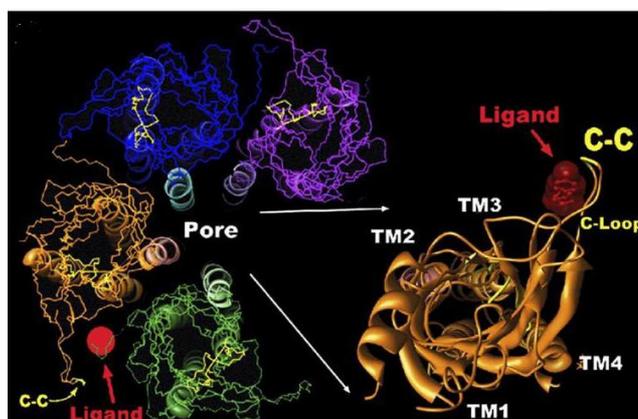


Fig. 10: Vista superior del poro iónico del receptor. El segmento transmembrana M2 de cada subunidad delimita el poro (Albuquerque et al., 2009).

Aproximadamente por la mitad del poro existe un estrechamiento debido a interacciones hidrofóbicas entre residuos de las cadenas M2 vecinas (posiciones 9' y 13'). Estas interacciones hidrofóbicas involucran a leucina 251 (α L251 en el receptor de *Torpedo*) y su vecina alanina (o serina), y a valina 255 (α V255) con fenilalanina (Miyazawa et al.,

2003). El diámetro del poro en esta zona es tan pequeño (~ 2 Å) (Cheng et al., 2006; Beckstein and Sansom, 2006) que no permite el pasaje de iones sodio o potasio. Esta región del poro podría corresponder a la compuerta del canal o *gate* (Fig. 11) (Miyazawa et al., 2003; Ivanov et al., 2007; Absalom et al., 2009).

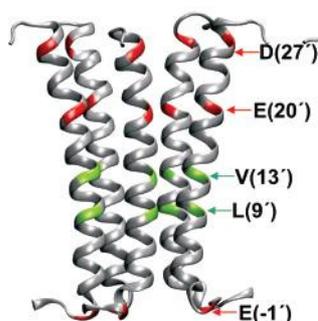


Fig. 11: Estructura del poro iónico del receptor nACh $\alpha 7$. En verde residuos hidrofóbicos que formarían la compuerta del canal. En rojo, residuos hidrofílicos que formarían el vestíbulo (Ivanov et al., 2007).

El poro del receptor nACh también contiene los filtros de selectividad. En las posiciones -2' y 2' de los segmentos M2 (Villarroel and Sakmann, 1992; Wang et al., 2008) existen residuos con carga negativa que facilitan el pasaje de cationes y previenen el ingreso de aniones y grandes moléculas al interior celular.

El segmento M2 no toma contacto con los segmentos M1 y M3, el espacio entre ellos contiene agua. Sin embargo, existen aproximaciones de ciertos residuos hidrofóbicos entre las cadenas de M2 y M3 (L250-I296, L257-I289 y V261-V285 en la subunidad α de *Torpedo*) y entre M2 y M1 (L253-F225) (Miyazawa et al., 2003).

2.2.3 Dominio intracelular

El dominio intracelular consiste en un gran *loop* citoplasmático que conecta los segmentos M3 y M4. Su longitud es variable entre las distintas subunidades (110 a 270 residuos) y tiene una estructura corta de α -hélice. Sin embargo, esta estructura no es bien resulta a 4 Å y parece estar distorsionada (Unwin, 2005). En conjunto, estas hélices forman el vestíbulo intracelular del poro iónico y presenta cargas negativas.

Esta región intracelular está asociada a proteínas del citoesqueleto, tales como rapsina (Burden et al., 1983; Froehner, 1991), que permiten el agrupamiento de los receptores en determinados sitios de la membrana (Bruneau and Akaaboune, 2007). Esta región también contribuye con la cinética del receptor nACh muscular (Bouzat et al., 1994) y contiene los determinantes de conductancia del receptor 5-HT_{3A} (Kelley et al., 2003; Rayes et al., 2005).

Finalmente, el *loop* M3M4 contiene sitios de fosforilación que modulan la expresión, la desensibilización y la interacción con proteínas del citoesqueleto (Huganir et al., 1986; Swope et al., 1995; Wang et al., 2004).

En los receptores activados por ligando de procariontas (GLIC y ELIC), este dominio no está presente, indicando que no es esencial para la activación del canal (Bocquet et al., 2007; Hilf and Dutzler, 2008).

2.3 ASPECTOS FUNCIONALES

2.3.1 Cambios conformacionales inducidos por el agonista

La unión de ACh o de otros agonistas colinérgicos al receptor desencadena un proceso reversible conocido como gatillado (Fig. 12) (Cederholm et al., 2009; Chang et al., 2009; Bartos et al., 2009a), que finaliza con el pasaje de iones (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) por el poro. Este proceso resulta en la despolarización de la membrana celular y la subsecuente modulación de la actividad neuronal o contracción muscular.

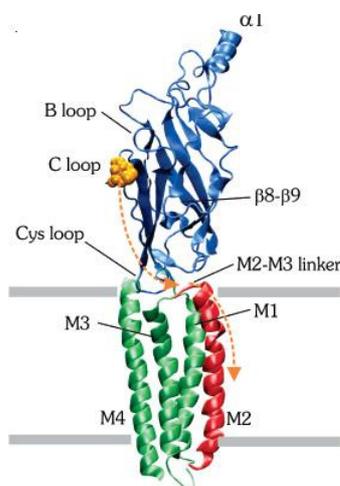


Fig. 12: Esquema de los movimientos producidos durante el gatillado (Ivanov et al., 2007).

Etapa I: Unión del agonista

El agonista interactúa con el sitio de unión mediante puentes de hidrógeno, fuerzas dipolo-cación, van der Waals e interacciones π -cación (Celie et al., 2004; Dougherty, 2007; Liu et al., 2008). En el lado principal predominan las interacciones π -cación entre grupos aromáticos de residuos (fenilalanina, tirosina y triptofano) y la carga positiva del agonista (Dougherty,

2007). En todos los casos, las interacciones se complementan con las de los residuos menos conservados del lado complementario, aportando de esta manera especificidad a la unión.

En ausencia de agonista, el *loop C* se encuentra en una conformación abierta o hacia afuera (Fig. 13). Cuando el agonista llega al sitio de unión, el *loop C* se mueve hacia el centro del receptor interaccionando con el ligando y los residuos del lado complementario. Este efecto “atrapa” al agonista (Fig. 13) (Cheng et al., 2006; Ulens et al., 2006; Wang et al., 2009). Como el *loop C* está conectado directamente al extremo N-terminal de M1 por medio de $\beta 10$, los cambios iniciales se traducen hacia la interfase entre los dominios extracelular y transmembrana.

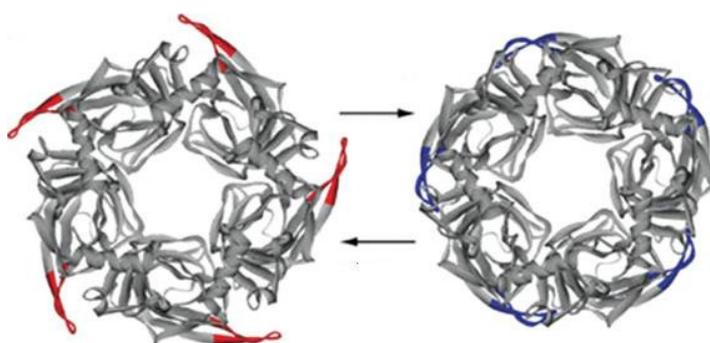


Fig. 13: Cambios conformacionales del *loop C* en el estado abierto (izquierda) y en el cerrado (derecha) (Hansen et al., 2005).

Etapa II: Función de la interfase entre los dominios extracelular y transmembrana

La interfase entre el dominio unidor de agonista y el formador del poro iónico es una zona estructural de transición donde las hojas plegadas β del dominio extracelular están en estrecho contacto con los extremos de las hélices α del dominio transmembrana (Fig. 14). Los cambios conformacionales producidos luego de la unión del agonista, se transfieren al segmento M2 por medio de esta región, produciendo la apertura del poro.

Esta región está formada por estructuras provenientes del dominio extracelular como el *loop* $\beta 1\beta 2$, Cys-loop, $\beta 8\beta 9$ y el final de $\beta 10$, y otras del dominio transmembrana como la región pre-M1, el *linker* M2M3 y el final de M4 (post-M4) (Fig. 14).

Previamente en el laboratorio se demostró el rol de la interfase entre los dominios extracelular y transmembrana creando una quimera conteniendo en el dominio extracelular, secuencias de la proteína unidora de ACh (AChBP) y en el transmembrana, secuencias del receptor de serotonina (5-HT_{3A}) (Bouzat et al., 2004). La quimera resultante unía ACh pero

no era funcional. Únicamente cuando se reemplazaron las secuencias de los *loops* Cys-, $\beta 1\beta 2$ y $\beta 8\beta 9$ de la AChBP por secuencias de 5-HT_{3A}, se restauró el acoplamiento funcional de la interfase y la funcionalidad del receptor (Bouzat et al., 2004). Estos resultados resaltan la importancia de las interacciones alostéricas específicas entre ambos dominios.

En los últimos años surgieron numerosas publicaciones que muestran residuos de los diferentes *loops* de la interfase que interactúan entre sí para permitir el acoplamiento de los dominios extracelular y transmembrana (Lee and Sine, 2005; Lummis et al., 2005; Xiu et al., 2005; Grutter et al., 2005a; Jha et al., 2007; Lee et al., 2008; Lee et al., 2009). Las evidencias experimentales sugieren que los diferentes subtipos de receptores nicotínicos utilizan distintas combinaciones de residuos para generar una respuesta acorde a las necesidades fisiológicas de las células postsinápticas.

La importantísima y compleja función de la interfase entre ambos dominios es clave en la apertura del canal (Xiu et al., 2005; Gay and Yakel, 2007; Bouzat et al., 2008; Cederholm et al., 2009; Chang et al., 2009). Este punto será discutido en detalle en el Capítulo II.

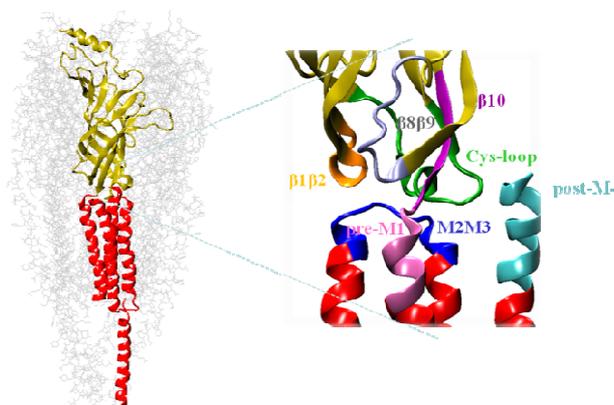


Fig. 14: Interfase entre el dominio unidor de agonista y el formador del poro iónico. Izquierda: Representación del nAChR con una subunidad destacada, con el dominio extracelular en amarillo y el transmembrana en rojo. Derecha: Interfase con los *loops* coloreados en naranja ($\beta 1\beta 2$), gris ($\beta 8\beta 9$), verde (Cys-loop), violeta ($\beta 10$), rosa (pre-M1), azul (M2M3) y celeste (post-M4).

Etapa III: Apertura del poro

Los cambios generados en el dominio extracelular e interfase, llevan al movimiento de las hélices α de los segmentos M2. Las interacciones hidrofóbicas de la compuerta del canal se desestabilizan y se rompen de manera transitoria. El diámetro del poro aumenta

aproximadamente 1 Å (Cheng et al., 2006) permitiendo el flujo de iones a través de él (Unwin, 2005).

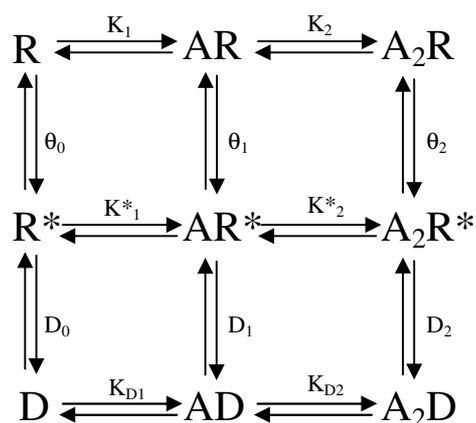
El mecanismo por el cual el poro se abre todavía está en discusión. En un primer momento se postuló una rotación en bloque de los segmentos M2 (Miyazawa et al., 2003). Estudios posteriores de simulación establecieron, de acuerdo al modelo estructural utilizado, que las α -hélices de M2 sufrirían una inclinación (Hilf and Dutzler, 2009a), otras posturas defienden una rotación de M2 (Liu et al., 2008), y otras, una mezcla de ambas (Cheng et al., 2007).

2.3.2 Estados funcionales

El receptor nACh es una proteína alostérica que presenta diversos estados conformacionales interconvertibles. El modelo concertado de dos estados, también conocido como el modelo de Monod-Wyman-Changeux (MWC), establece que el ligando induce un cambio de conformación en el receptor hacia otros estados preexistentes (al menos dos) mediante un equilibrio reversible. Los agonistas pueden seleccionar y estabilizar la conformación del estado abierto, mientras que los antagonistas competitivos, el estado cerrado.

Para el receptor nACh se ha establecido al menos tres estados conformacionales: cerrado o de reposo, abierto y desensibilizado. El estado de reposo presenta baja afinidad por los ligandos y no es conductor de iones, el estado abierto tiene alta afinidad por los ligandos y es conductor, y el estado desensibilizado tiene aún alta afinidad por los ligandos pero no es conductor. El estado de reposo se da principalmente en ausencia de ligando, la unión de la ACh o de otros agonistas colinérgicos genera la transición del estado de reposo al abierto. El estado desensibilizado ocurre frente a exposiciones prolongadas de agonistas. Luego de que el agonista es removido del sitio de unión, el receptor retorna al estado de reposo nuevamente.

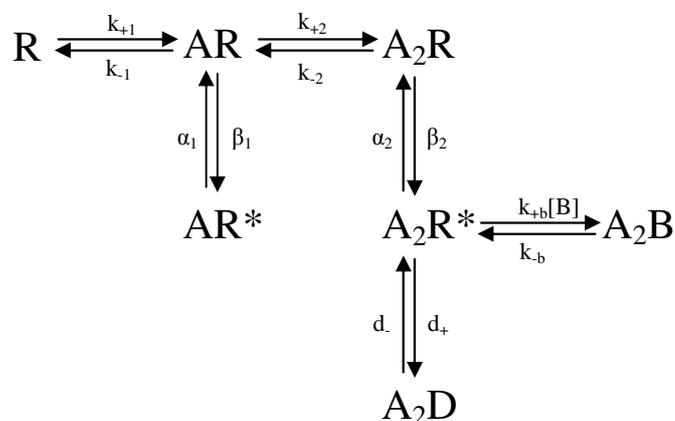
El receptor nACh muscular es el mejor caracterizado de toda la familia. Según el modelo alostérico, el mecanismo de activación que define su cinética se detalla en el Esquema 1 (Sine et al., 1990; Dilger, 2002).



Esquema 1

En el Esquema 1, los estados de reposo (R, no conductor), abierto (R*, conductor) y desensibilizado (D, no conductor) del receptor se interconvierten en ausencia de agonista (A). La activación ocurre en forma progresiva a medida que el receptor es ocupado por dos moléculas de agonistas. La eficacia para activarse, medida por la constante θ , es mayor para el receptor biligado que para el receptor en estado de reposo. Las constantes de disociación para los estados de reposo, abierto y desensibilizados son K , K^* y K_D (Dilger, 2002). La activación ocurre rápidamente mientras que la desensibilización es más lenta. Las velocidades dependen del subtipo de receptor nACh.

El Esquema 1 puede simplificarse teniendo en cuenta que: i) las aperturas del canal en el estado de reposo ocurren esporádicamente; ii) la desensibilización se da principalmente desde el estado biligado abierto; y iii) y la recuperación de ésta se produce por el camino desensibilizado (Dilger and Liu, 1992).



Esquema 2

En el Esquema 2, dos moléculas de agonistas (A) se unen al receptor (R) en el estado de reposo con constantes de asociación k_{+1} y k_{+2} y disociación k_{-1} y k_{-2} . El receptor ocupado por un agonista (monoligado) se abre con una velocidad β_1 y se cierra con una velocidad α_1 , y ocupado por dos agonistas (biligado), con una velocidad de apertura β_2 y con una velocidad de cierre α_2 . La constante de equilibrio de gatillado del canal (θ) se obtiene de la razón entre las velocidades de apertura y cierre del receptor biligado (β_2/α_2) (Sine et al., 1990). A altas concentraciones de agonista, el receptor biligado (A_2R^*) puede desensibilizarse con velocidad d_+ y recuperarse de la desensibilización con velocidad d_- . El agonista en altas concentraciones también puede bloquear el poro del canal (A_2B) llevando al receptor a un estado no conductor con una velocidad de bloqueo $k_{+b}[B]$ y de desbloqueo k_{-b} , respectivamente.

El análisis cinético nos permite evaluar diversas mutaciones que producen cambios en las distintas constantes y de esta manera relacionar la estructura con la función del receptor.

A nivel de canal único, la activación del receptor nACh muscular por ACh puede explicarse en base al Esquema 2 (Fig. 15). A medida que la concentración de ACh aumenta, se estabilizan los estados AR y A_2R , ya que el equilibrio se desplaza hacia la derecha. A bajas concentraciones de agonista la activación es en forma de eventos aislados. El histograma de tiempo de estado abierto se ajusta con dos componentes, el más largo (~ 1 ms) corresponde al receptor biligado A_2R^* y el más breve (~ 0.2 ms) al monoligado AR^* (Fig. 15). El área del componente más breve de apertura, disminuye a altas concentraciones de ACh ya que el receptor se encuentra principalmente en el estado biligado abierto. La duración del componente más largo de apertura se mantiene constante a lo largo de las distintas concentraciones de ACh.

Con el aumento progresivo de la concentración (10 a 300 μM), la activación ocurre en forma de *clusters*. Los *clusters* de activación se definen como episodios de numerosas aperturas sucesivas separadas por tiempos mayores que un tiempo crítico que se obtiene del histograma de cierre del canal (Bouzat et al., 2000) y corresponden a aperturas y cierres de una misma molécula de receptor. Los cierres dentro del *cluster* se hacen cada vez más breves a medida que aumenta la concentración de agonista ya que existe un aumento de las velocidades de asociación (k_{+1} y k_{+2}), por lo tanto, el área mayoritaria de los histogramas de cierre se desplaza hacia tiempos más breves. La probabilidad de apertura (P_{apertura}) dentro de un *cluster*, es la probabilidad de encontrar al canal abierto en el tiempo que dura el cluster, y aumenta ~ 0.1 a ~ 1 con concentraciones de ACh entre 10 y 300 μM , respectivamente.

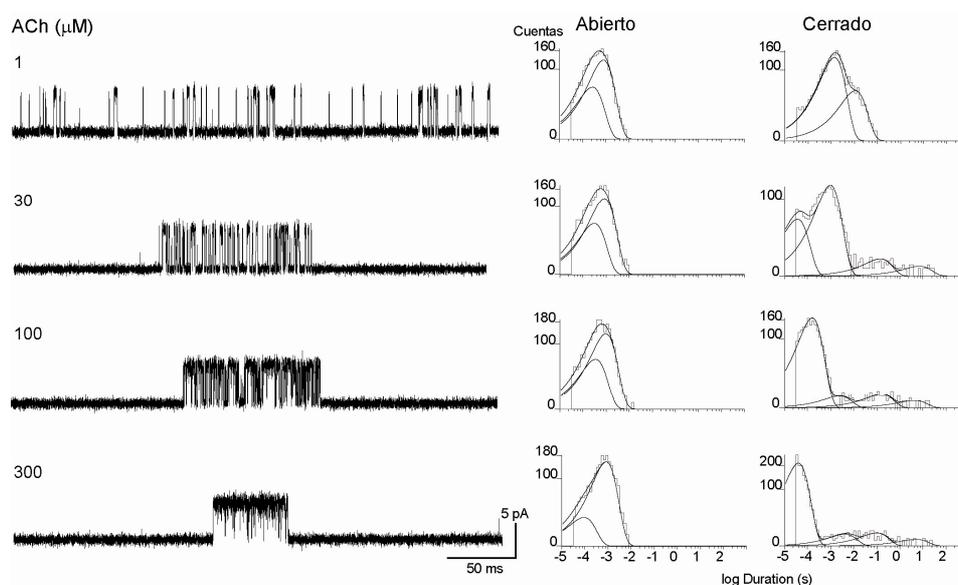


Fig. 15: Activación del receptor nACh muscular adulto por ACh. Izquierda: Trazos de corrientes unitarias obtenidas en la configuración *cell-attached* activadas con ACh 1, 30, 100 y 300 μM . Derecha: Histogramas de tiempo de estado abierto y cerrado correspondiente a cada condición. Potencial de membrana: -70mV .

La cinética de activación del receptor nativo $\alpha 7$ y la de la quimera $\alpha 7\text{-}5\text{HT}_{3\text{A}}$ fueron estudiados en este trabajo y se detallarán en los Capítulos I y II de esta Tesis.

2.3.3 Subtipos de receptores nACh

Distintos subtipos de receptores nACh se expresan en el sistema nervioso central, así también como en la periferia mediando la transmisión sináptica en la placa neuromuscular y ganglios. Los nAChRs se encuentran también en células no-neuronales/no-musculares (Gotti and Clementi, 2004; Gahring and Rogers, 2005; Kalamida et al., 2007; Gotti et al., 2007).

Receptor nACh muscular

El receptor nACh muscular está localizado postsinápticamente en la placa neuromuscular donde recibe señales de las motoneuronas.

La estequiometría del receptor nACh muscular fetal antes de la innervación o luego de la denervación y en órganos eléctricos de peces es $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$. Durante la miogénesis, la expresión del receptor en la membrana de los mioblastos es baja, luego, en el músculo maduro aumenta, localizándose exclusivamente en la membrana postsináptica de la placa neuromuscular. En el músculo adulto la subunidad γ es reemplazada por ϵ , originando

receptores con estequiometria $(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$ (Kalamida et al., 2007). El lado principal del sitio de unión de agonistas está formado por residuos que provienen de la subunidad $\alpha 1$ y el lado complementario por aminoácidos de ϵ y γ/δ . Los dos sitios de unión presentan diferente afinidad por la ACh (Ackermann and Taylor, 1997).

El receptor nACh muscular es blanco de enfermedades hereditarias y adquiridas que causan un deterioro de la transmisión neuromuscular y debilidad muscular, entre las que podemos nombrar a la miastenia gravis (Gilhus, 2009) y a los síndromes miasténicos congénitos de canal rápido y lento (Engel et al., 2009).

Receptores nACh neuronales

Los receptores nACh neuronales expresan en el sistema nervioso central y periférico, en ganglios y células no excitables (queratinocitos, múltiples células del aparato digestivo, células endoteliales, glia, células sanguíneas). Hasta el momento se clonaron nueve subunidades α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) y tres β ($\beta 2$ - $\beta 4$) (Gotti and Clementi, 2004; Dani and Bertrand, 2007; Gotti et al., 2007; Taly et al., 2009). Las distintas combinaciones de subunidades generan receptores localizados en distintas regiones, con diferentes propiedades farmacológicas y cinéticas (Gotti et al., 2007; Taly et al., 2009).

Las subunidades $\alpha 7$ - $\alpha 9$ pueden formar homopentámeros ($\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$) o heteropentámeros ($\alpha 7/\alpha 8$ y $\alpha 9/\alpha 10$) (Plazas et al., 2005). En cambio, las subunidades $\alpha 2$ - $\alpha 6$ y $\beta 2$ - $\beta 4$ forman heteropentámeros con la estequiometria $(\alpha_x)_2(\beta_y)_3$ (Kalamida et al., 2007; Gotti et al., 2007). Los receptores nACh neuronales pueden ubicarse en áreas presinápticas actuando como autoreceptores o heteroreceptores que regulan la liberación de varios neurotransmisores como ACh, 5-HT, glutamato, dopamina, noradrenalina y GABA, o postsinápticas, mediando la transmisión excitatoria rápida entre células nerviosas, así también como la expresión genética, la diferenciación celular y supervivencia (Kalamida et al., 2007).

Los receptores nACh neuronales también expresan en células no excitables (Gahring and Rogers, 2005). Se encuentran en múltiples tipos celulares que incluyen la glia, queratinocitos, células endoteliales, múltiples tipos celulares del sistema digestivo, pulmón y sistema inmune como linfocitos, monocitos, macrófagos (Macklin et al., 1998; Maus et al., 1998; Conti-Fine et al., 2000; Wessler et al., 2003; Gotti and Clementi, 2004; De Rosa et al., 2005; Gahring and Rogers, 2005; Kalamida et al., 2007; Gotti et al., 2007; Albuquerque et al., 2009). Muchas de esas células sintetizan y liberan ACh.

Los receptores nACh neuronales están involucrados en numerosas enfermedades y son blancos terapéuticos para el tratamiento de las mismas. El rol fisiopatológico que desempeñan no está todavía definido. Están implicados en las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, en la esquizofrenia, en el síndrome de déficit de atención, epilepsias hereditarias, entre otras, así también como en los tratamientos para dejar de fumar (Kalamida et al., 2007).

3- MODULACIÓN FARMACOLÓGICA

Los receptores nACh son blancos de numerosos compuestos y drogas terapéuticas.

Los fármacos afectan las transiciones entre los distintos estados conformacionales del receptor. Si actúan en el sitio de unión del neurotransmisor endógeno, son agonistas o antagonistas competitivos, mientras que si lo hacen en otro sitio son inhibidores o activadores no competitivos (Fig. 16). Adicionalmente al sitio de unión de la ACh, se han identificado sitios involucrados en la unión de moduladores alostéricos, esteroides y bloqueadores competitivos o moduladores alostéricos negativos (Fig. 16) (Zouridakis et al., 2009).

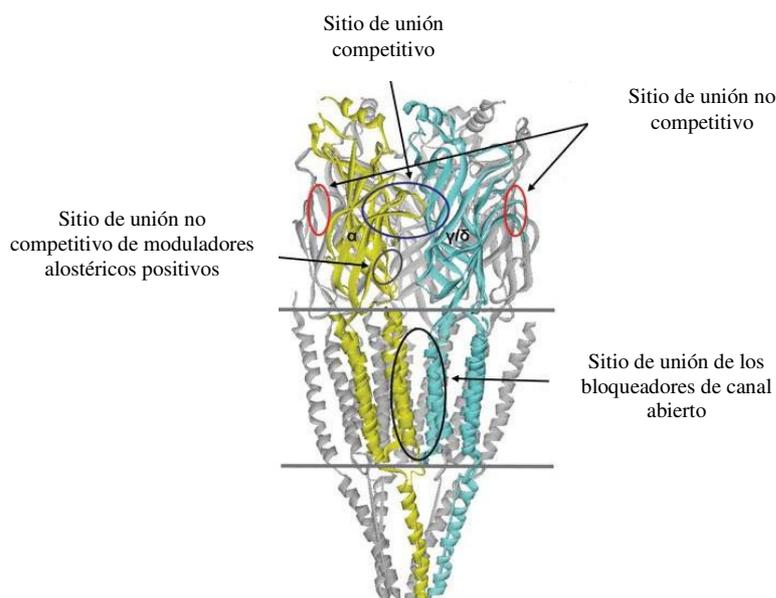


Fig. 16: Representación esquemática de la localización de los sitios de unión de los ligandos competitivos y no competitivos (Zouridakis et al., 2009).

La co-cristalización de varias AChBPs de molusco con diversos agonistas y antagonistas reveló detalles de las interacciones entre ligandos y residuos específicos del sitio de unión a través de estudios *in silico*, *screenings* farmacológicos y análisis de rayos X

(Taylor et al., 2007; Ulens et al., 2009; Rucktooa et al., 2009). Se espera identificar determinantes moleculares que permitan desarrollar drogas altamente selectivas para el tratamiento de enfermedades en las cuales el receptor esté implicado.

A continuación nombraré las características de los fármacos utilizados en este trabajo de Tesis.

3.1 Agonistas completos y parciales

Los agonistas completos son fármacos capaces de generar la máxima respuesta del receptor, es decir, producen la transición del receptor del estado de reposo al abierto con máxima efectividad. Los agonistas parciales no son capaces de generar la máxima respuesta aún en presencia de altas concentraciones. Los mecanismos de esta parcialidad no están todavía dilucidados aunque en los últimos años se han realizado importantes avances (ver discusión Capítulo I). La ventaja de usar agonistas parciales radica que, a diferencia de los agonistas completos, no generan superestimulación de los receptores y se evita los efectos adversos tales como desensibilización, tolerancia, dependencia (Zhu, 2005).

El sitio de unión de los distintos agonistas puede coincidir total o parcialmente con el del neurotransmisor endógeno ACh (sitio de unión ortostérico). Diversos estudios cristalográficos demostraron que los agonistas interactúan con residuos del lado principal del sitio de unión a través de puentes hidrógeno, interacciones dipolo-cación, π -cación y fuerzas de Van der Waals (Celie et al., 2004; Dougherty, 2007; Liu et al., 2008). Las interacciones se complementan con las de los residuos del lado menos (Zouridakis et al., 2009). Los agonistas con grupo amonio terciario o cuaternario interactúan con residuos tirosina y triptofano de los *loops* A, B, C y D, mediante fuerzas π -cación (Celie et al., 2004; Ulens et al., 2009; Taly et al., 2009).

Los agentes antihelmínticos actúan, de acuerdo al subtipo de receptor nACh, como agonistas completos o parciales (Rayes et al., 2001; Rayes et al., 2004; Bartos et al., 2006b; Bartos et al., 2009b). Este tema es parte del trabajo de Tesis y será desarrollado en el Capítulo I.

3.2 Antagonistas competitivos

Los fármacos antagonistas son moléculas que se unen en el mismo sitio que el neurotransmisor endógeno pero no pueden desarrollar ningún efecto o acción farmacológica.

Generalmente interaccionan con cierto número de residuos del sitio de unión impidiendo, de esta manera, la unión del neurotransmisor endógeno.

Diversos estudios cristalográficos de AChBPs con antagonistas competitivos demostraron que, a diferencia de los agonistas, la unión involucra interacciones puente hidrógeno y fuerzas de Van de Waals con residuos altamente conservados del lado principal del sitio de unión de agonistas, especialmente residuos del *loop* C, y con residuos menos conservados del lado complementario, especialmente del *loop* F (Zouridakis et al., 2009). La principal diferencia con la unión de los agonistas es que el *loop* C no “atrapa” a la molécula de antagonista (Zouridakis et al., 2009).

Existen numerosos antagonistas competitivos, como las neurotoxinas de serpientes y conotoxinas de caracoles. Dentro de ellas, usamos la α -Bungarotoxina (α -Btx) que proviene del veneno de la serpiente *Bungarus multicinctus* como antagonista competitivo del receptor nACh $\alpha 7$ (Barnard et al., 1977; Albuquerque et al., 2009).

3.3 Inhibidores no competitivos: Bloqueadores de canal abierto

Los inhibidores no competitivos pueden actuar por diversos mecanismos: (1) a través del bloqueo del canal cuando se encuentra en el estado abierto, (2) o por medio de mecanismos alostéricos: (a) estabilizando estados conformacionales no conductores (reposo o desensibilizado) o (b) incrementando la velocidad de desensibilización (Arias et al., 2006a). Ejercen sus efectos de una manera distinta a la de los antagonistas competitivos, los cuales modulan actuando en el sitio de unión ortostérico de los nAChRs.

En este trabajo de Tesis describimos la acción de los fármacos antihelmínticos como bloqueadores de canal abierto. La inhibición del receptor por medio de este mecanismo sería simplemente el bloqueo estérico o físico del poro, es decir, el fármaco se ubica en el poro y de esta manera no permite el pasaje de iones a través de él. Los sitios de unión de los bloqueadores se encuentran distribuidos en el dominio transmembrana, en particular dentro de la compuerta y en la entrada de los filtros de selectividad (Taly et al., 2009). El bloqueo del canal se produce sin afectar la unión del agonista por su sitio. En el caso de los fármacos antihelmínticos, éstos actúan como agonistas y a su vez como bloqueadores del poro una vez que activan con distinta eficacia al receptor (Rayes et al., 2001; Rayes et al., 2004; Bartos et al., 2006a; Bartos et al., 2009b).

Como ejemplos de otros inhibidores o antagonistas no competitivos se encuentran determinados anestésicos, ciertos neuroesteroides y antidepresivos tricíclicos (Valera et al., 1992; Arias et al., 2006a; Arias et al., 2006b; Gumilar and Bouzat, 2008; Arias et al., 2009).

4- ACCIÓN DE LOS ANTIHELMÍNTICOS SOBRE LOS nAChRs

Las drogas antihelmínticas son utilizadas para controlar, prevenir y tratar las infestaciones tanto en humanos como en animales domésticos. La infestación por parásitos afecta a un cuarto de la población mundial y se relaciona estrechamente con factores geográficos, sociales y económicos. Se distribuye ampliamente en zonas tropicales y subtropicales. La carga de la enfermedad recae desproporcionadamente sobre poblaciones de bajos recursos, donde existe saneamiento inadecuado, sobrepoblación, bajos niveles de educación y falta de acceso a la asistencia sanitaria. La farmacoterapia utilizada en el tratamiento de las infestaciones tiene el objetivo de afectar al agente causante sin generar daño al huésped. Cuando un fármaco antihelmíntico es utilizado continuamente sin control se genera resistencia contra él y probablemente contra otro que tenga el mismo mecanismo de acción.

Las drogas antihelmínticas tienen dos modos principales de acción (Martin et al., 1997). Pueden actuar sobre los canales iónicos de los gusanos actuando en forma rápida, o sobre blancos bioquímicos de acción con efectos más lentos. En el primer grupo tenemos drogas que actúan sobre los receptores nicotínicos de ACh (levamisol, pirantel, morantel, oxantel) (Robertson and Martin, 1993; Evans and Martin, 1996), sobre receptores de GABA (piperazine) (Martin, 1985), de glutamato permeable a cloruros (ivermectina, doramectina, etc) (Martin, 1996) y los que afectan la permeabilidad de la membrana al calcio (praziquantel) (Redman et al., 1996). En el segundo grupo, tenemos como ejemplo a los antihelmínticos que afectan a la β -tubulina (tiabendazol, cambendazol), al metabolismo del malato (diamfenetido), y al metabolismo del ácido araquidónico (dietilcarbamizina).

Entre los antihelmínticos que actúan sobre los receptores nACh presentes en las células musculares de los parásitos encontramos a los imidazotiazoles (levamisol y butamisol), tetrahidropirimidinas (pirantel, morantel y oxantel), sales cuaternarias de amonio y pirimidinas (metiridina). Estas drogas producen despolarización de la célula en forma permanente sin afectar a los receptores del hospedador. El gusano muere por parálisis espástica.

Los antihelmínticos, actúan como agonistas completos de los nAChRs de los gusanos (Martin et al., 1996), y como agonistas parciales de los receptores nicotínicos musculares de

mamíferos (Rayes et al., 2001; Rayes et al., 2004; Bartos et al., 2009b). En los últimos años, se ha determinado que estos antihelmínticos pueden tener un diferente modo de acción dependiendo del subtipo de receptor nACh de mamífero. Pueden actuar como agonistas completos y más potentes que el propio neurotransmisor endógeno (Bartos et al., 2006b; Bartos et al., 2009b) o como moduladores alostéricos (Levandoski et al., 2003; Wu et al., 2008).

La acción de los antihelmínticos sobre los subtipos de receptores nACh, así como el desarrollo de la resistencia será desarrollada en detalle en el Capítulo I.

METODOLOGÍA

METODOLOGÍA

1- SUBUNIDADES SALVAJES, MUTADAS Y QUIMÉRICAS

En este trabajo de Tesis utilizamos el ADNc (ADN complementario) de subunidades del receptor nACh muscular adulto de mamífero ($\alpha 2\beta\delta\epsilon$), del receptor homopentamérico neuronal $\alpha 7$, de la chaperona Ric-3, de la proteína verde fluorescente *GFP*, del receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT_{3A} de alta conductancia (AC) y de las quimeras formadas a partir de $\alpha 7$ -5HT_{3A}. El ADNc de las distintas subunidades se encuentran subclonadas en el vector de expresión pRBG4 (Sine, 1993).

La forma de alta conductancia de la quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A} (Eisele et al., 1993) se construyó previamente en el laboratorio y se caracterizó en detalle (Rayes et al., 2005). En esta quimera, los tres residuos argininas responsables de la baja conductancia del receptor de serotonina tipo 3A (5HT_{3A}) se mutaron por R432Q, R436D y R440A (Kelley et al., 2003).

Construimos las subunidades mutadas y quiméricas utilizando un kit de mutagénesis Sitio-dirigidas *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis kit* (Stratagene, Inc., TX). Las secuencias se confirmaron con cortes con enzimas de restricción y secuenciación.

2- EXPRESIÓN DE RECEPTORES

Para expresar los receptores nACh utilizamos células BOSC 23, una variante de la línea HEK 293 (*Human Embryonic Kidney*). Las mismas son mantenidas en cultivo con medio DMEM y suero fetal bovino.

Transfectamos estas células con el ADNc de las subunidades salvajes, mutadas y quiméricas utilizando el método de precipitación con fosfato de calcio, como se describió previamente (Bouzat et al., 1994; Bouzat et al., 2000; Bouzat et al., 2002). El ADNc del receptor salvaje neuronal $\alpha 7$ se co-transfectó con el de la chaperona Ric-3 (Williams et al., 2005) en la proporción $\alpha 7$ -Ric-3 de 1:4 necesaria para la expresión en superficie del receptor. Incluimos en todas las transfecciones un plásmido que codifica para una proteína verde fluorescente (*GFP*) en la proporción 1:10, para poder identificar las células transfectadas bajo el microscopio de fluorescencia cuando son irradiadas con luz ultravioleta.

De acuerdo a la expresión del subtipo de receptor nACh o quimérico, realizamos los estudios electrofisiológicos luego de 12, 24 ó 48 horas de la transfección.

3- ESTUDIOS ELECTROFISIOLÓGICOS

Los estudios electrofisiológicos se llevaron a cabo utilizando la técnica de *Patch-clamp* en tres configuraciones diferentes de acuerdo a la finalidad del experimento y el tipo de receptor: *cell-attached*, *outside-out* y *whole-cell* (Hamill et al., 1981).

Obtuvimos los registros de canal único en la configuración *cell-attached* (Hamill et al., 1981) a un potencial de membrana de -70 mV y a 20°C, como se describió previamente (Bouzat et al., 2004; Rayes et al., 2005). Brevemente, un sello en esta configuración (Fig. 17) se obtiene tocando una célula con la punta de la pipeta y aplicando un pulso de presión negativa para que se forme un sello de alta resistencia (mayor a 20 GΩ) de manera tal que la corriente que observemos corresponda al flujo de iones a través de los canales existentes en el parche formado.

La configuración *whole-cell* se consigue rompiendo un sello de alta resistencia formado entre la pipeta y la membrana celular con un pulso fuerte de presión negativa. La configuración *outside-out* se obtiene con un paso adicional que consiste en remover lentamente la pipeta de la célula para que se forme una vesícula pequeña (Fig. 17). En la configuración *whole-cell* registramos la corriente de todos los canales presentes en una célula y en la configuración *outside-out*, la de un grupo de canales. La corriente obtenida en *whole-cell* generalmente es más lenta en alcanzar el pico máximo. De acuerdo al tipo de receptor y a la finalidad del experimento se utilizó una u otra configuración.

En la figura 17 se esquematiza las diferentes configuraciones de la técnica de *Patch-clamp* utilizadas en este trabajo de Tesis.

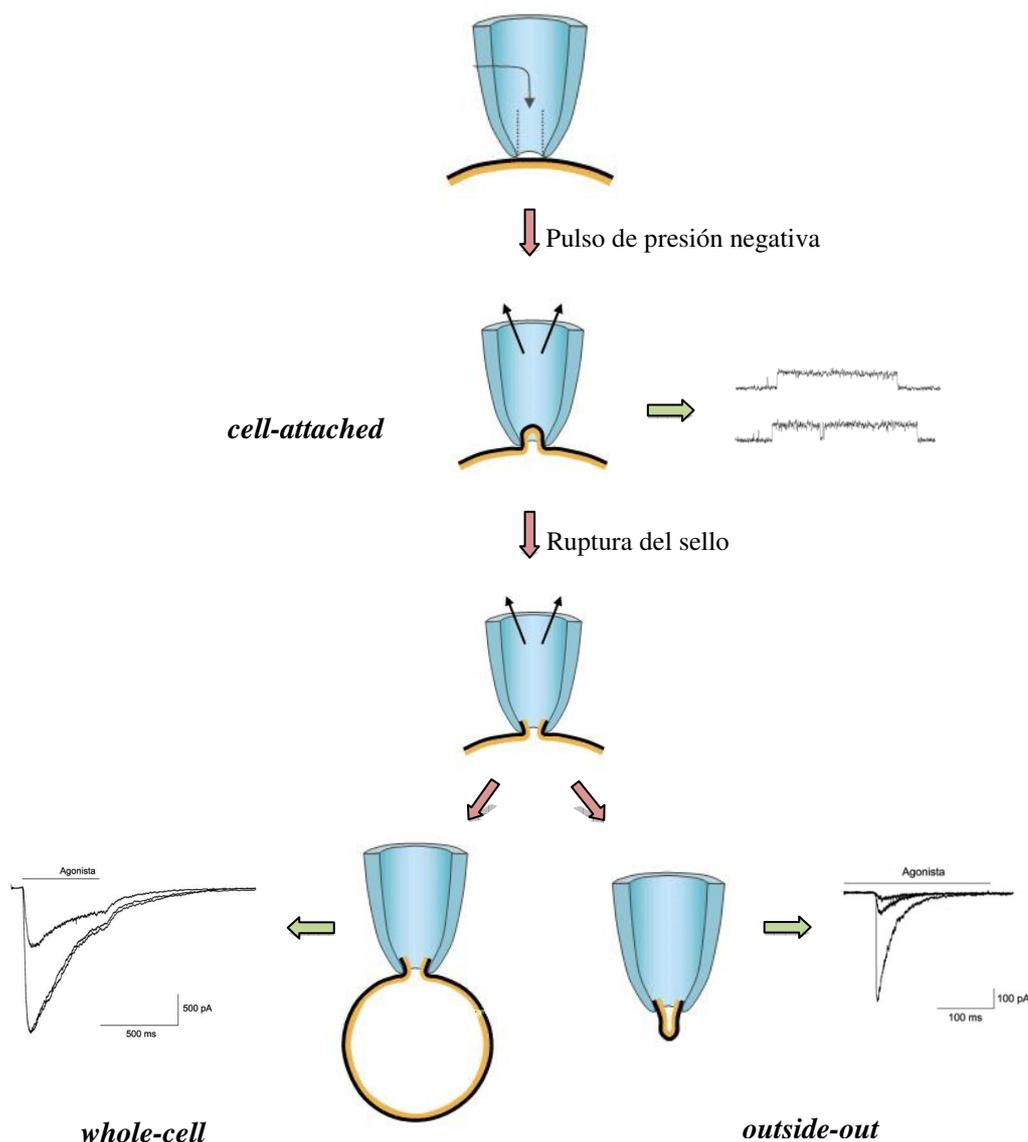


Fig. 17: Distintas configuraciones de la técnica electrofisiológica de *Patch-clamp*.

3.1 Equipo y pipetas

El equipo utilizado en esta técnica está compuesto de las siguientes partes: Amplificador Axopatch 200 B (Axon Instruments, Inc., CA); Interfase PCI-6111E (National Instruments, Austin, TX); Programas de software, Acquire (Bruyton Corporation, Seattle, WA) y TAC 4.0.10 (Bruyton Corporation, Seattle, WA); Microscopio invertido Nikon Eclipse TS100 o Zeiss Axiovert S100 con sistema de epifluorescencia; Manipulador PatchMan Eppendorf.

Para obtener corrientes macroscópicas es necesario contar además con un sistema de perfusión. El sistema de perfusión está formado por: reservorios de soluciones suspendidos en un extremo superior del equipo, por encima del sistema experimental, para que las soluciones fluyan con la gravedad, válvulas de cambio y de pellizco (conocidas como válvulas *switching* y *solenoid-driven pinch*), y dos tubos de un diámetro de 0.3 mm orientados a 90° dentro de la cápsula de cultivo. Por un tubo circula solución extracelular sin agonista y por el otro, solución con el agonista.

En la configuración *whole-cell*, la salida del sistema de perfusión se acerca a la célula, mientras que en la configuración *outside-out*, la pipeta con la vesícula celular se coloca en la intersección de la salida de las soluciones de los dos tubos. Cuando la válvula se abre mediante un sistema computacional, la solución fluye por un único lado a la vez. Este sistema de perfusión permite un cambio rápido de soluciones que bañan la célula o la vesícula formada. El tiempo que tarda la solución en cambiar de un lado a otro se calcula aplicando un pulso de 500 ms con la solución utilizada en el baño diluída a la mitad. El tiempo de cambio es de 0.1 a 1 ms.

En la Fig. 18 se muestra uno de los equipos utilizados en el laboratorio.



Fig. 18: Equipo de *Patch-clamp* utilizado en el laboratorio.

Las pipetas utilizadas se cortaron a partir de tubos capilares 7052 (Garner Glass, CA) con un Puller (SUTTER INSTRUMENT, modelo P-97). Luego, estas pipetas de vidrio de resistencia entre 5-7 M Ω , se pulieron con calor para suavizar la terminación de la punta y se pintaron en el extremo de la punta con Sylgard (Dow Corning, Midland MI, USA) para

minimizar el ruido del sello al disminuir la capacitancia del vidrio dentro de la solución de baño.

3.2 Registros de canal único: Configuración *cell-attached*

3.2.1 Soluciones

Para los receptores quiméricos $\alpha 7$ -5HT_{3A} se utilizó una solución conteniendo 140 mM KCl, 5.4 mM NaCl, 0.2 mM CaCl₂, y 10 mM HEPES (pH 7.4). Esta solución libre de magnesio y bajo en calcio se usó para minimizar el bloqueo del poro de serotonina de los receptores quiméricos por cationes bivalentes (Rayes et al., 2005; Bouzat et al., 2008).

Para el receptor $\alpha 7$ y el nACh muscular, se utilizó una solución con 140 mM KCl, 5.4 mM NaCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.7 mM MgCl₂ y 10 mM HEPES (pH 7.4).

3.2.2 Drogas utilizadas

Como control se utilizó al neurotransmisor endógeno ACh. Las drogas antihelmínticas, levamisol, morantel, pirantel y oxantel (Sigma-Aldrich), se utilizaron en diferentes rangos de concentración. Estos se detallan en los Resultados del Capítulo I.

3.2.3 Registros y análisis de corrientes unitarias

Las corrientes de canal único se registraron utilizando un amplificador de *Patch-clamp* Axopatch 200 B (Axon Instruments, Inc., CA), se digitalizaron a intervalos de 5 μ s con la interfase PCI-6111E (National Instruments, Austin, TX), se filtraron a 10 kHz y se grabaron en el disco rígido de la computadora usando el programa Acquire (Bruyton Corporation, Seattle, WA).

Los canales se analizaron con el programa TAC 4.0.10 (Bruyton Corporation, Seattle, WA) utilizando un criterio de umbral de amplitud media y un ancho de banda final de 10 kHz (Bouzat et al., 2000; Rayes et al., 2005). Los histogramas de tiempo de estado abierto, cerrado y de burst se graficaron usando en la abscisa una escala logarítmica y en la ordenada raíz cuadrada (Sigworth and Sine, 1987) y se ajustaron con la suma de funciones exponenciales por máxima probabilidad usando el programa TACFit (Bruyton Corporation, Seattle, WA). Se tomó la duración del componente más largo de apertura (tiempo medio de apertura aparente) para comparar los tiempos de apertura entre los distintos receptores.

3.2.4 Análisis cinético

El análisis cinético se realizó como se describió anteriormente utilizando el programa MIL (Bouzat et al., 2000; Bouzat et al., 2002; Rayes et al., 2005). En este trabajo de Tesis se ha realizado el análisis cinético del receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT_{3A} activado con ACh y antihelmínticos (Capítulo I) y del receptor nACh $\alpha 7$ (Capítulo II).

Para encontrar los diferentes modelos cinéticos que reflejen la activación de los receptores, y obtener las velocidades de las transiciones para cada estado ajustamos los histogramas experimentales a curvas teóricas obtenidas en base a los cálculos realizados por el programa MIL (www.qub.buffalo.edu, QuB Suite, Buffalo, NY). El programa permite ajustar simultáneamente distintos histogramas experimentales y calcula las constantes cinéticas usando algoritmos de máxima similitud que corrige los eventos perdidos (Qin et al., 1996). Las funciones de densidad teórica para los tiempos de estado abierto y cerrado fueron calculadas por el programa a través del ajuste de las constantes de velocidad y el tiempo de máxima resolución del equipo de *Patch-clamp* (30 μ s). El modelo propuesto y las velocidades calculadas fueron aceptadas si las funciones de densidad teóricas ajustaron correctamente los histogramas experimentales de estado abierto y cerrado.

En el receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT_{3A} la activación ocurre en *bursts*. Los *bursts* reflejan la actividad de un único canal. Los mismos se identifican como una serie de aperturas sucesivas rodeados por intervalos de cierres mayores que un tiempo crítico específico (t_{crit}). El t_{crit} se obtiene del punto de intersección entre el segundo y tercer componentes del histograma de cierres. Para la quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A} este tiempo es de 2 ms. Con el t_{crit} se construye el histograma de *burst*. La duración del *burst* corresponde a la duración del componente más lento de este histograma. Para cada registro, se determinó la homogeneidad cinética seleccionando *bursts* en base a las distribuciones del tiempo medio de estado abierto, tiempo medio de estado cerrado y probabilidad de apertura (Wang et al., 1997; Bouzat et al., 2000; Rayes et al., 2005). Se seleccionaron *bursts* con distribuciones que entraban dentro de 2 DS (desvíos estándar) del componente principal. Se seleccionaron más del 90 % de los *bursts*, cada uno conteniendo tres o más aperturas.

Para estimar los parámetros cinéticos del receptor nACh $\alpha 7$, donde los canales se abren principalmente en forma de eventos aislados, se corrigió el tiempo medio de apertura aparente por eventos perdidos dividiendo el tiempo total correspondiente a las aperturas más largas por el número total de cierres asociados a esas aperturas.

Para el resto de los receptores quiméricos utilizados en el Capítulo II también se identificaron *bursts* y *clusters* de activación. Nuevamente los *bursts* de activación se identificaron como una serie de aperturas sucesivas separadas por un tiempo mayor a un tiempo crítico ($t_{critburst}$). Los *clusters*, en cambio, se definen como episodios de activación formados por un gran número de aperturas separadas nuevamente por tiempos mayores a un tiempo crítico diferente del anterior ($t_{critcluster}$). Son episodios de intensa activación formados por agrupamientos de *bursts*. El t_{crit} de los *bursts* ($t_{critburst}$) se tomó de la intersección entre el primer y segundo componentes de cierre, y el de los *clusters* ($t_{critcluster}$), entre el segundo y tercer componentes, respectivamente. La duración del *burst* o del *cluster* se obtiene del histograma de tiempo de estado abierto construido a partir del t_{crit} correspondiente. La probabilidad de apertura dentro de un *cluster* ($P_{apertura}$) indica la fracción de tiempo que el canal permanece abierto dentro del mismo.

3.3 Registro de corrientes macroscópicas: Configuraciones *outside-out* y *whole-cell*

3.3.1 Solución intracelular (ICS)

La solución intracelular se colocó dentro de la pipeta. La composición de esta solución fue 134 mM KCl, 5 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, y 10 mM HEPES (pH 7.3).

3.3.2 Solución extracelular (ECS)

Para los receptores quiméricos se utilizó una solución conteniendo 150 mM NaCl, 0.5 mM CaCl₂, y 10 mM HEPES (pH 7.3). Esta solución bajo en calcio y sin magnesio se usó para minimizar el bloqueo del poro de 5-HT_{3A} por iones bivalentes (Rayes et al., 2005; Bouzat et al., 2008).

Para el receptor $\alpha 7$ y el nACh muscular, se utilizó una solución con 150 mM NaCl, 1.8 mM CaCl₂, 1mM MgCl₂ y 10 mM HEPES (pH 7.3).

3.3.3 Drogas utilizadas

Como control se utilizó al neurotransmisor endógeno ACh. Las drogas antihelmínticas, pirantel, morantel, oxantel y levamisol (Sigma-Aldrich), se agregaron en diferentes rangos de concentración detallados en los resultados del Capítulo I a la solución extracelular (ECS)

3.3.4 Registro y análisis de corrientes macroscópicas

Las corrientes macroscópicas se registraron a un potencial de -50 mV, se filtraron a 5 kHz y digitalizaron a 20 kHz. En algunos experimentos se utilizó un potencial positivo de +120 mV para disminuir el efecto de bloqueo del canal abierto producido por los fármacos antihelmínticos.

El análisis de los datos se realizó utilizando el programa IgorPro (WaveMetrics Inc., Lake Oswego, Oregon). La corriente media se calculó de 5-10 trazos individuales. Las corrientes se ajustaron con una única función exponencial:

$$I_{(t)} = I_0 \exp (-t / \tau_d) + I_\infty$$

donde I_0 e I_∞ son los valores de las constantes del pico y del equilibrio (estado estacionario) y τ_d es la constante de tiempo de caída debida a desensibilización. Los registros de corrientes se alinearon entre ellos en el punto donde alcanzaron el 50 % de su máximo nivel. El pico de corriente (I_0) corresponde al valor obtenido por extrapolación de la corriente de caída en ese punto.

Debido a que las corrientes del receptor nACh $\alpha 7$ decaen rápidamente, la constante de tiempo de caída se obtuvo del promedio de 28 corrientes individuales de 6 parches diferentes obtenidos en la configuración *outside-out*. Las corrientes del receptor 5-HT_{3A} mostradas en este trabajo de Tesis pertenecen a un trabajo publicado de nuestro laboratorio por Corradi y colaboradores (2009).

Las mediciones de dosis-respuesta se realizaron a partir de la configuración *whole-cell*. El EC₅₀ y el coeficiente de Hill se calcularon del análisis de la regresión no lineal usando la ecuación de Hill:

$$I/I_{max} = 1/[1+(EC_{50}/L)^{nH}]$$

donde EC₅₀ es la concentración de agonista capaz de generar la mitad de la máxima respuesta, nH es el coeficiente de Hill y L es la concentración de agonista.

La recuperación de la desensibilización del receptor nACh $\alpha 7$ se determinó de los registros de corrientes macroscópicas obtenidos en la configuración *whole-cell* a un potencial de -50 mV y con un pulso de 150 ms de ACh 1 mM. Luego se aplicó un segundo pulso de ACh 1 mM a intervalos de entre 0.25 y 6 segundos luego del final del primer pulso de ACh.

La fracción de recuperación de la corriente iniciada por el segundo pulso se graficó versus el intervalo entre pulsos.

Se simularon corrientes macroscópicas del receptor nACh $\alpha 7$ usando un el *software* QuB (QUB Suite, State University of New York, Buffalo). Se utilizaron los valores del Esquema 2.1 del Capítulo II. Se varió el valor de la constante de apertura β , entre 5000 a 20000 s⁻¹. Las corrientes simuladas se analizaron con el programa SigmaPlot 7.101.

4- ESTUDIOS DE DOCKING

Los estudios *in silico* fueron realizados en el laboratorio de Sara Lummis (University of Cambridge, UK). A partir de la proteína unidora de ACh (AChBP) de *Lymnaea stagnalis* (PDB ID: 1UW6) se construyó por homología el dominio extracelular del receptor nACh $\alpha 7$. La secuencia aminoacídica se alineó usando el programa FUGUE (Shi et al., 2001) y luego se modeló usando MODELLER 6, versión 2 (Sali and Blundell, 1993). De los 10 modelos generados, se eligió para los estudios de *docking* el de menor energía y con el menor porcentaje de aminoácidos no reconocidos mediante el programa Ramachandran plot (RAMPAGE) (Lovell et al., 2003).

Las formas protonadas de morantel y oxantel se construyeron con el programa Chem3D Ultra 7.0 (CambridgeSoft, Cambridge, UK) y se minimizaron usando los campos de fuerza MM2 y AM1.

Los estudios de *docking* se realizaron con los ligandos y el modelo del sitio de unión de agonistas del receptor nACh $\alpha 7$. Las distintas orientaciones de las moléculas en el sitio de unión de agonistas son mostradas en el Capítulo I.

CAPÍTULO I

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Los receptores nACh, miembros de la superfamilia de receptores Cys-loop, intervienen en la transmisión sináptica del sistema nervioso de vertebrados e invertebrados. Están implicados en un gran número de patologías y son blancos de numerosas drogas. En los vertebrados, esta superfamilia está formada por canales selectivos a cationes: los receptores nACh y los receptores de serotonina (5-HT₃); y selectivos a aniones: los receptores GABA y los de glicina (Le Novère N. and Changeux, 2001; Lester et al., 2004). En invertebrados, esta superfamilia también incluye a los canales de GABA catiónicos (Beg and Jorgensen, 2003) y los canales de ACh, serotonina, glutamato, aminas biógenas, e histamina selectivos a aniones (Vassilatis et al., 1997; Zheng et al., 2002; Putrenko et al., 2005; Wolstenholme and Rogers, 2005; Jones and Sattelle, 2008; Ringstad et al., 2009).

Los receptores nACh pueden ensamblarse a partir de cinco subunidades idénticas, formando homopentámeros, como el receptor neuronal $\alpha 7$, o diferentes subunidades α y no- α , formando heteropentámeros, como el receptor nACh muscular adulto ($\alpha 2\beta\epsilon\delta$). Ambos subtipos de receptores son estudiados en este trabajo de Tesis. Los receptores nACh musculares de nematodos tienen un interés considerable ya que son blancos de drogas antiparasitarias. Es interesante notar que el helminto de vida libre *Caenorhabditis elegans*, el cual ha sido modelo para el estudio de nematodos parásitos, tiene uno de las más grandes y diversas familias de genes de receptores nACh conocidas (Jones and Sattelle, 2004). La composición de cada subtipo de receptor nACh no se conoce hasta el momento.

El sitio de unión de agonistas está ubicado en la interfase de dos subunidades adyacentes en el dominio extracelular (Brejc et al., 2001; Unwin, 2005). Uno de los lados, el principal, está formado por residuos de subunidades α , y el otro, el complementario, por aminoácidos de subunidades α y no- α .

Las drogas antihelmínticas que actúan sobre los receptores nACh son extensamente usadas para combatir las parasitosis ya que causan hipercontracción de los músculos de nematodos y luego la muerte por parálisis espástica. La eficacia de estas drogas está basada en su habilidad por actuar como agonistas completos de los receptores nACh de nematodos (Martin et al., 1996). De manera opuesta, demostramos en nuestro laboratorio que levamisol y pirantel son agonistas débiles del receptor nACh muscular de mamífero (Rayaes et al., 2001; Rayaes et al., 2004). En los últimos años, se demostró que estas drogas podían interactuar con

algunos subtipos de receptores neuronales con diversos efectos. Pirantel y morantel son agonistas completos del receptor $\alpha 7$ (Bartos et al., 2006a; Bartos et al., 2009b), morantel es un modulador alostérico positivo del receptor $\alpha 3\beta 2$ (Wu et al., 2008) y levamisol es un modulador positivo de $\alpha 3\beta 4$ (Levandoski et al., 2003). De esta manera, vemos que la acción de los agentes antihelmínticos depende del subtipo de receptor nACh. Las bases moleculares de esta selectividad no han sido dilucidadas completamente. Para comprender las bases estructurales de la activación diferencial de los subtipos de receptores nACh por agentes antihelmínticos exploramos: i) como dos drogas antihelmínticas, morantel y oxantel, activan al receptor nACh muscular; ii) como los fármacos antihelmínticos activan al receptor nACh neuronal $\alpha 7$; iii) y las bases moleculares de la activación diferencial de los diferentes subtipos de receptores nACh por antihelmínticos.

Los agentes antihelmínticos utilizados en este trabajo de Tesis son: levamisol (perteneciente al grupo de los imidazotiazoles) y pirantel, morantel y oxantel (pertenecientes a la familia de las tetrahidropirimidinas). Las estructuras químicas se muestran en la Figura 1.1.

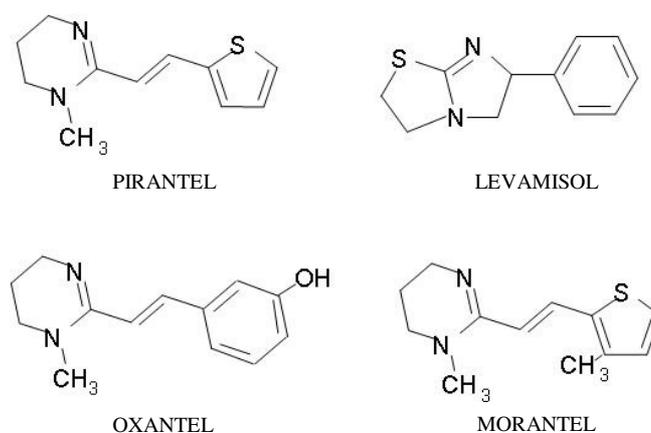


Fig. 1.1: Estructura química molecular de los fármacos antihelmínticos estudiados en este trabajo de Tesis.

Los estudios se llevaron a cabo utilizando la forma de alta conductancia del receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT_{3A} (Fig. 1.2) (Rayes et al., 2005) como modelo de $\alpha 7$. Esta quimera tiene numerosas ventajas que la convierten en un excelente modelo para los estudios farmacológicos del receptor $\alpha 7$: presenta a diferencia de $\alpha 7$, alta expresión en superficie de células de mamífero en cultivo, permite detectar fácilmente corrientes a nivel de canal único

y fue caracterizada cinéticamente en detalle, por lo tanto se pueden evaluar los cambios en las constantes de activación producidos por diferentes fármacos.

El receptor $\alpha 7$ -5HT_{3A} de alta conductancia está formado por secuencias del receptor $\alpha 7$ en el dominio extracelular y de 5-HT_{3A} en el transmembrana (Fig. 1.2). Esta quimera presenta tres residuos mutados en el *loop* M3M4 intracelular responsables de la conductancia del receptor (ver Metodología).

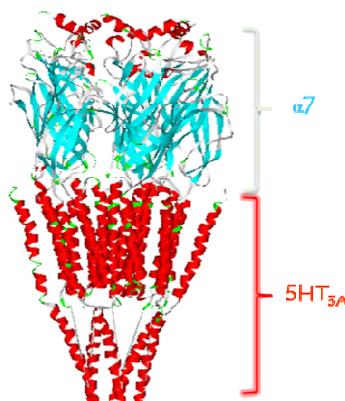


Fig. 1.2: Estructura de la quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A} utilizada como modelo del receptor nACh $\alpha 7$. En el dominio extracelular, secuencias de $\alpha 7$ (celeste) y en el transmembrana, de 5-HT_{3A} (rojo).

Estos estudios proveen una nueva perspectiva para comprender la activación diferencial de los diferentes subtipos de receptores nACh por fármacos antihelmínticos y para identificar diferencias específicas que pueden ser exploradas terapéuticamente. También ayudan a entender como los parásitos desarrollan resistencia a las drogas antiparasitarias.

RESULTADOS

1- ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR nACh MUSCULAR ADULTO POR MORANTEL Y OXANTEL

En trabajos previos realizados en el laboratorio, se estudió la acción de pirantel (Rayes et al., 2001) y levamisol (Rayes et al., 2004) sobre el receptor nAChR muscular adulto de mamífero. Ambos antihelmínticos son agonistas poco eficaces y bloqueadores de canal abierto del receptor nACh muscular. Levamisol es un agonista menos eficaz que pirantel y presenta menor efecto de bloqueo. La constante de equilibrio por el bloqueo (K_B) es de 190

μM para levamisol y $8 \mu\text{M}$ para pirantel respectivamente, a un potencial de -70 mV . En la figura 1.3 se muestran registros de canal único tomados de los trabajos de Rayes y colaboradores (2001 y 2004) donde se ve la activación por ACh, pirantel y levamisol a 1 y $300 \mu\text{M}$. Las aperturas producidas por estos agentes son breves y nunca ocurren en *clusters* en todos los rangos de concentración testeados, en comparación con la activación producida por ACh.

A concentraciones de ACh mayores de $10 \mu\text{M}$, la activación del receptor nACh muscular es en forma de *clusters* (ver Introducción) (Bouzat et al., 2000). Cada episodio de activación comienza con la transición del estado desensibilizado al activable y termina cuando retorna nuevamente al estado desensibilizado (Bouzat et al., 2000).

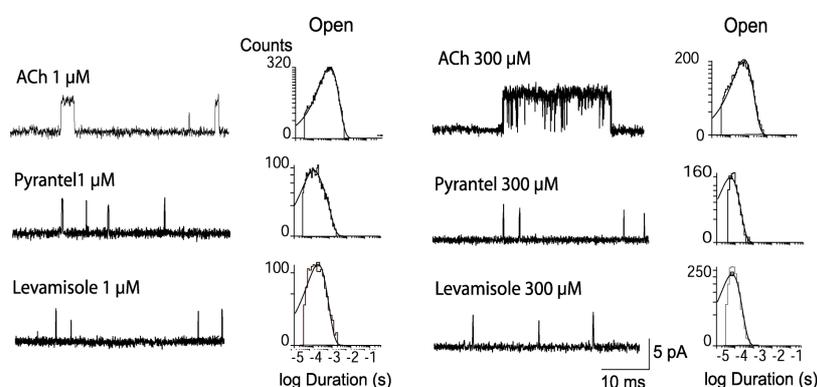


Fig. 1.3: Trazos de registros de canal único del receptor nACh muscular activados con 1 y $300 \mu\text{M}$ de ACh, pirantel y levamisol, acompañados del correspondiente histograma de tiempo de estado abierto. Potencial de membrana -70 mV . Figuras tomadas de Rayes et al., 2001, 2004.

1.1 Efecto de morantel y oxantel sobre corrientes de canal único del nAChR muscular de mamífero

Comenzamos este trabajo evaluando la activación del receptor nACh muscular adulto por otros dos fármacos antihelmínticos, morantel y oxantel, a nivel de canal único y macroscópico. Las corrientes unitarias iniciadas por concentraciones bajas y altas de estas drogas son más breves que las generadas por el neurotransmisor endógeno ACh (Fig. 1.4). Las distribuciones de tiempo de estado abierto para ambos antihelmínticos a una concentración $1 \mu\text{M}$ son similares ya que los histogramas se ajustan con un único componente de aproximadamente $250 \mu\text{s}$. La duración del componente principal del receptor

activado por ACh es de 1 ms (Bouzat et al., 2000). Cuando incrementamos la concentración de morantel de 1 a 300 μM no observamos los típicos *clusters* producidos por ACh. La activación es en forma de eventos aislados en todas las concentraciones testeadas (Fig 1.4). En cambio, para oxantel se observa una activación en forma de *clusters* a altas concentraciones pero con cierres, dentro de estos períodos de activación, más prolongados que los de ACh. A una concentración de oxantel de 300 μM , la probabilidad de apertura dentro de esos *clusters* (P_{apertura}) es aproximadamente 0.1, mientras que para ACh es de 0.9 (Fig. 1.4) (Bouzat et al., 2000).

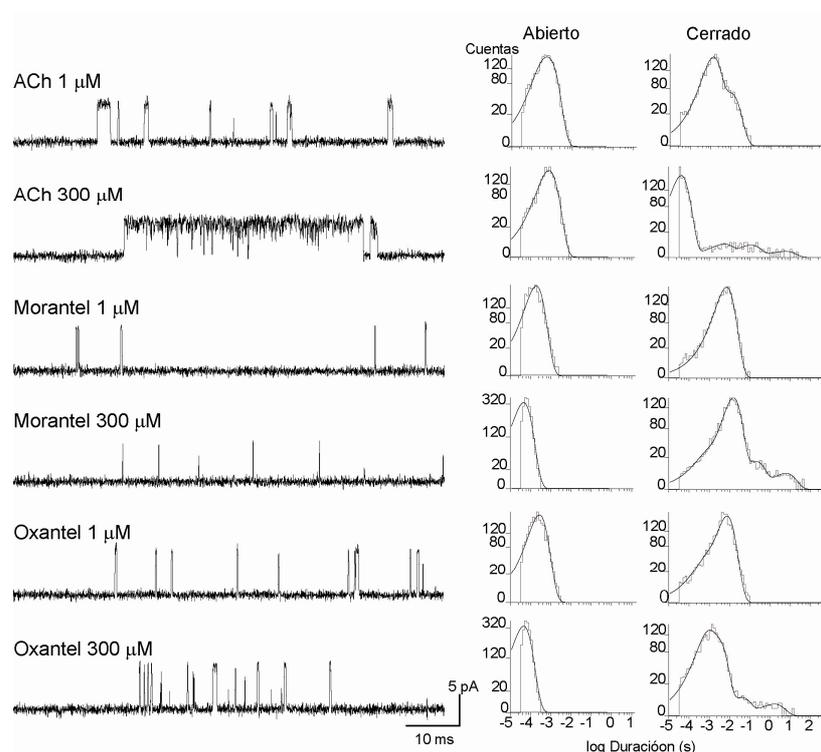
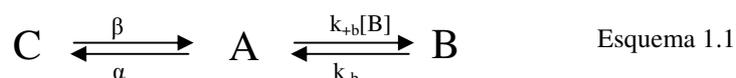


Fig. 1.4: Corrientes unitarias del receptor nACh muscular adulto activadas con 1 y 300 μM de ACh, morantel y oxantel. Izquierda: Trazos de corrientes con las aperturas hacia arriba. Derecha: Histogramas de tiempo de estado abierto y cerrado correspondientes a cada condición. Potencial de membrana: -70 mV.

1.2 Bloqueo de canal abierto del receptor nACh muscular por morantel y oxantel

Estas drogas se caracterizaron previamente como bloqueadoras del poro iónico de los receptores nACh de nematodos (Dale and Martin, 1995; Evans and Martin, 1996). Para describir el bloqueo de morantel y oxantel utilizamos el típico esquema de bloqueo de canal abierto (Esquema 1.1) (Neher and Steinbach, 1978; Rayes et al., 2004):



donde C, A y B son los estados cerrado, abierto y bloqueado, respectivamente. β y α son las velocidades de apertura y cierre, k_{+b} es la velocidad de bloqueo dependiente de la concentración de bloqueador [B] y k_{-b} la velocidad de desbloqueo. La constante k_{+b} se obtiene de la pendiente de la relación entre la inversa del tiempo medio de estado abierto y la concentración de la droga (Neher and Steinbach, 1978). k_{-b} se estima de la inversa del tiempo medio de estado cerrado correspondiente al bloqueo cuya área aumenta en función de la concentración de bloqueador (Neher and Steinbach, 1978). La constante de equilibrio para el bloqueo (K_B) se determina de la relación k_{-b}/k_{+b} .

Como los tiempos de apertura para ambos antihelmínticos son extremadamente breves, se estudió el efecto de bloqueo de canal abierto a partir de receptores activados con concentraciones saturadas de ACh y crecientes de bloqueador. La velocidad de desbloqueo (k_{-b}) es de 535 y 820 s^{-1} y de bloqueo (k_{+b}) es de 65.2×10^6 y $14.0 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ para morantel y oxantel, respectivamente. La constante de equilibrio para el bloqueo (K_B) es de 8.2 μM y 59.0 μM para morantel y oxantel, respectivamente, a un potencial de membrana de -70 mV.

1.3 Corrientes macroscópicas del nAChR muscular adulto activadas por morantel y oxantel

Evaluamos la eficacia de activación del receptor nACh muscular adulto por estas drogas mediante corrientes macroscópicas en la configuración *outside-out patch*. En la figura 1.5 mostramos corrientes obtenidas de un único parche *outside-out* expuesto a aplicaciones de ACh (control), morantel y oxantel. El pico de corriente fue de $6.0 \pm 1.2 \%$ para morantel y de $15.5 \pm 1.7 \%$ para oxantel con respecto al determinado por ACh. No se observaron cambios significativos en las corrientes obtenidas con concentraciones de antihelmínticos de 300 μM , sugiriendo que esos valores corresponden al pico máximo. Sin embargo, con concentraciones superiores a ésta, se observa una reducción en el pico de la corriente. Este efecto se debería al bloqueo del canal producido por estas drogas.

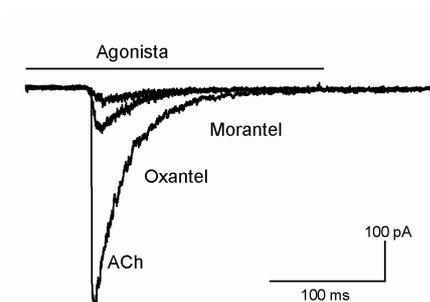


Fig. 1.5: Corrientes macroscópicas del nAChR muscular obtenidas en la configuración *outside-out* con concentraciones de ACh, morantel y oxantel de 100 μM . La barra sólida indica la duración de exposición al agonista. Potencial de membrana: -50 mV.

En conclusión, las aperturas breves, la falta de *clusters* de aperturas a altas concentraciones de morantel o la presencia de *clusters* de baja probabilidad de apertura para oxantel y el pico reducido de las corrientes *outside-out*, revelan que tanto morantel como oxantel, son agonistas poco eficaces del receptor nACh muscular adulto de mamífero, al igual que los antihelmínticos estudiados previamente (Rayes et al., 2001; Rayes et al., 2004). Además, estas drogas son potentes bloqueadoras del poro iónico del canal. Si comparamos las constantes de equilibrio para el bloqueo (K_B) de los cuatro antihelmínticos, vemos que morantel y pirantel tienen igual afinidad (8 μM), seguida de oxantel (59 μM) y finalmente levamisol (190 μM).

En síntesis, estos antihelmínticos son agonistas parciales del receptor nACh muscular adulto de mamífero. La eficacia de activación del receptor nACh muscular para los distintos fármacos es: oxantel > morantel = pirantel > levamisol.

2- ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS ANTIHELMÍNTICOS SOBRE EL RECEPTOR $\alpha 7$ NEURONAL

Evaluamos la activación del receptor nACh $\alpha 7$ utilizando como modelo a la quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A}. La utilización de quimeras es útil no sólo para estudios de estructura-función sino para evaluar la acción de la acción de diversas drogas sobre el dominio extracelular.

2.1 Corrientes unitarias del receptor nACh $\alpha 7$ activadas por agentes antihelmínticos

El receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT_{3A} de alta conductancia se caracterizó previamente en el laboratorio a nivel de canal único y macroscópico (Rayes et al., 2005). Las corrientes

unitarias se observan a concentraciones de ACh mayores de 30 μM . A una concentración de ACh de 500 μM , los canales aparecen como aperturas aisladas rodeadas por cierres largos o como *bursts* de varias aperturas sucesivas (Fig. 1.6). Los histogramas de tiempo de estado abierto se ajustan con 3 componentes cuyas duraciones y áreas relativas son: $\tau_1 = 6.20 \pm 0.20$ ms (0.50 ± 0.10), $\tau_2 = 0.80 \pm 0.30$ ms (0.16 ± 0.10), y $\tau_3 = 140 \pm 20$ μs (0.35 ± 0.10) (Fig. 1.6). Las duraciones y áreas de esos componentes no cambian en ninguna de las concentraciones testeadas de ACh (Rayes et al., 2005). La duración de los *bursts* registrados con ACh 500 μM es de 14.8 ± 3.9 ms (Rayes et al., 2005).

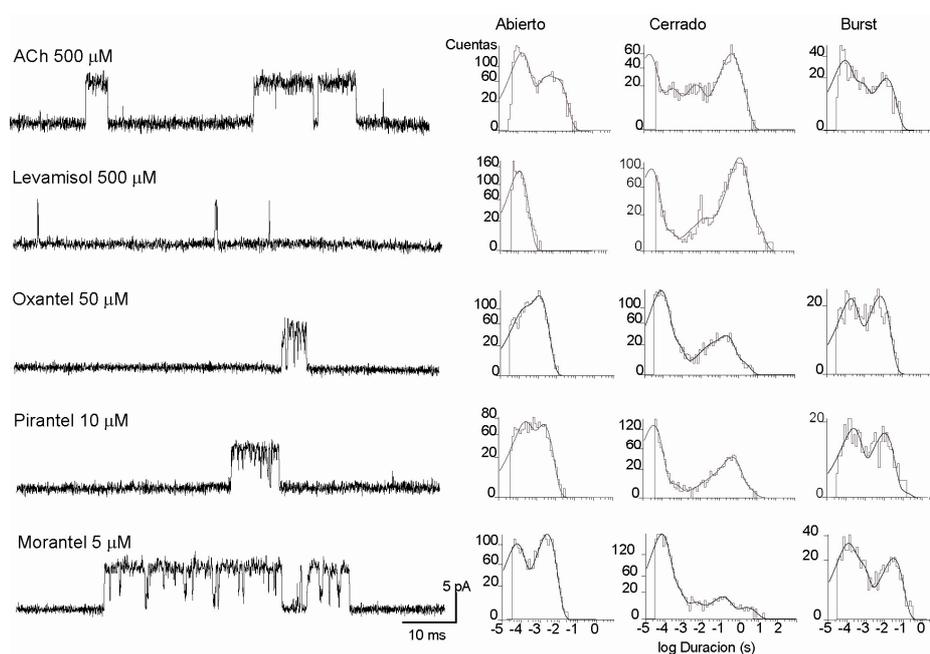


Fig. 1.6: Canales de la quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A} activados por ACh, levamisol, oxantel, pirantel y morantel a las concentraciones indicadas. Izquierda: Trazos de corrientes de canal único obtenidos en la configuración *cell-attached*. Derecha: Histogramas de tiempo de estado abierto, cerrado y de *burst* correspondientes a cada condición. Potencial de membrana: -70 mV.

Para explorar en detalle la activación de $\alpha 7$ por antihelmínticos, realizamos registros de canal único de la quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A} a un potencial de membrana de -70 mV. Los canales de levamisol se observan a concentraciones superiores a 500 μM (Fig. 1.6). Las aperturas son extremadamente infrecuentes y significativamente más breves que las activadas por ACh. Los histogramas de tiempo de estado abierto se ajustan con un único componente cuya duración es 50 veces más breve (127 ± 25 μs) que la del componente más lento activado con ACh 500 μM (6.20 ± 0.20 ms). Como el número de aperturas es extremadamente bajo, los histogramas

se construyeron sumando datos de al menos tres registros diferentes. Levamisol no logra activar al receptor en forma de *bursts*.

En presencia de oxantel, los canales únicos aparecen a concentraciones mayores de 50 μM (Fig. 1.6), indicando de nuevo, baja potencia de activación del receptor respecto a ACh. La distribución del tiempo de estado abierto se ajusta con dos componentes cuyas duraciones son más breves (1.05 ± 0.15 ms (0.70 ± 0.05) y 145 ± 65 μs (0.30 ± 0.05)) que las de los canales activados por ACh. La activación de los canales es en forma de *burst*, pero la duración del mismo (6.2 ± 0.8 ms; $p < 0.05$, $n = 6$) es más breve que la obtenida con ACh.

Detectamos corrientes unitarias de pirantel a concentraciones tan bajas como 10 μM (Fig. 1.6). La distribución de los tiempos de apertura presenta dos componentes, cuyas duraciones y áreas relativas son: 2.60 ± 0.55 ms (0.60 ± 0.04) y 240 ± 50 μs (0.40 ± 0.04). La diferencia que existe en los tiempos de aperturas con respecto a ACh se debe al hecho que pirantel actúa también como bloqueador de canal abierto (ver más adelante). La duración del *burst* activado por pirantel 10 μM (10.6 ± 1.9 ms) no es estadísticamente diferente del obtenido con ACh 500 μM (14.8 ± 3.9 ms; $p > 0.05$, $n = 6$).

Registramos canales únicos de morantel a concentraciones más bajas aún (5 μM) que pirantel (Fig. 1.6). Los tiempos de estado abierto presentan las siguientes duraciones y áreas relativas: 2.45 ± 0.15 ms (0.60 ± 0.05) y 80.0 ± 15.0 μs (0.40 ± 0.05). El tiempo medio de estado abierto del *burst* es más prolongado que el de ACh (26.0 ± 3.0 ms; $p < 0.05$, $n = 6$).

Podemos inferir hasta el momento que pirantel y morantel son agonistas completos y más potentes que la ACh para el receptor $\alpha 7\text{-5HT}_{3\text{A}}$, mientras que levamisol y oxantel son agonistas parciales. La eficacia de activación de estas drogas en el receptor $\alpha 7$ es: morantel > pirantel > ACh > oxantel >> levamisol.

2.2 Bloqueo del poro del receptor quimérico $\alpha 7\text{-5HT}_{3\text{A}}$ por drogas antihelmínticas

Se ha demostrado en numerosas oportunidades que los agentes antihelmínticos actúan como bloqueadores del canal iónico una vez que el poro se abre (Rayes et al., 2001; Rayes et al., 2004), independientemente de que la activación haya sido generada o no por la misma droga. También se ha demostrado que diversos agonistas nicotínicos, como nicotina y colina, actúan como bloqueadores de canal abierto de la quimera $\alpha 7\text{-5HT}_{3\text{A}}$ de alta conductancia (Rayes et al., 2005). Por lo tanto examinamos el bloqueo de $\alpha 7\text{-5HT}_{3\text{A}}$ por los fármacos antihelmínticos

pirantel, morantel, oxantel y levamisol. En este receptor, el bloqueo es producido en el poro de 5-HT_{3A}.

Cuando incrementamos la concentración del fármaco antihelmíntico (excepto para levamisol), observamos un claro efecto oscilatorio del canal entre el estado abierto y el cerrado (conocido como *flickering*) y una disminución del tiempo de estado abierto. En la Figura 1.7 mostramos este efecto sólo para pirantel. A una concentración de pirantel de 300 μM , el histograma de tiempo de estado abierto se ajusta con un único componente de $165 \pm 30 \mu\text{s}$.

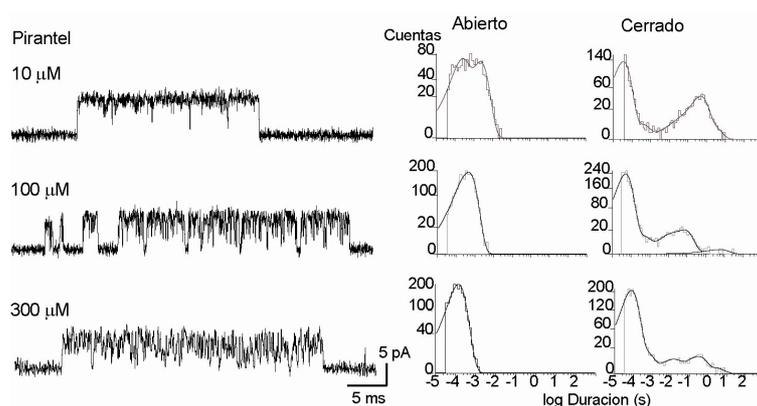


Fig. 1.7: Bloqueo de canal abierto producido por pirantel en el receptor $\alpha 7$ -5HT_{3A}. Izquierda: Corrientes de canal único registradas en presencia de pirantel 10, 100 y 300 μM . Derecha: Histogramas de tiempo de estado abierto y cerrado correspondientes a las diferentes concentraciones. Potencial de membrana: -70 mV.

Como las aperturas generadas por levamisol son infrecuentes, evaluamos el bloqueo del canal activando a la quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A} con ACh 500 μM . Cuando incrementamos la concentración de levamisol, observamos un desplazamiento del tiempo de estado abierto hacia duraciones más breves (Fig. 1.8).

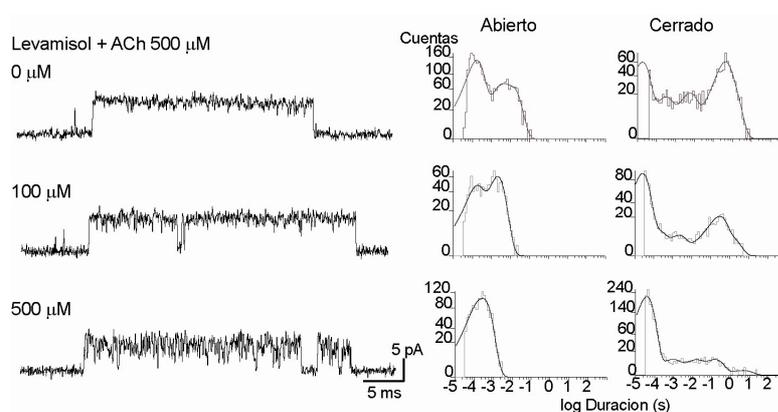


Fig. 1.8: Bloqueo del poro de la quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A} producido por levamisol. Izquierda: Trazos de corrientes registrados en presencia de ACh 500 μ M y levamisol 100 ó 500 μ M. Derecha: Histogramas de tiempo de estado abierto y cerrado de los registros correspondientes. Potencial de membrana: -70 mV.

Los bloqueadores de canal abierto son drogas que generan una disminución del tiempo medio de estado abierto en función de la concentración, junto con la presencia de un tiempo de cierre (correspondiente al bloqueo) constante con la concentración pero cuya área aumenta en función del aumento de la droga. Dado que estos fármacos se ajustan a estas propiedades, podemos inferir que son bloqueadores del poro del receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT_{3A}. Los valores de las distintas constantes para el bloqueo basadas en el Esquema 1.1 (Neher and Steinbach, 1978; Rayes et al., 2004) se detallan en la Tabla 1.1. En esta tabla podemos ver los distintos tiempos de bloqueo para los diversos fármacos antihelmínticos junto con las constantes de velocidad de bloqueo (k_{+b}), de desbloqueo (k_{-b}) y equilibrio (K_B). Como mencionamos en la sección anterior, la velocidad de bloqueo (k_{+b}) la obtenemos de la pendiente de la recta que se obtiene de graficar la inversa del tiempo medio de estado abierto vs la concentración de bloqueador; la duración de la constante de desbloqueo (k_{-b}) la estimamos de la inversa del tiempo más breve de cierre, cuya área aumenta en función de la concentración de la droga; y finalmente, la constante de equilibrio (K_B), la obtenemos de la relación k_{-b}/k_{+b} .

Antihelmíntico	T _{bloqueo} (μ s)	k_{-b} (s^{-1})	k_{+b} ($M^{-1}s^{-1}$)	K_B (mM)
MORANTEL	80 \pm 9	12550	36.5 x 10 ⁶	0.34
PIRANTEL	70 \pm 10	14200	26.5 x 10 ⁶	0.53
OXANTEL	86 \pm 7	11630	4.3 x 10 ⁶	2.80
LEVAMISOL	30 \pm 3	33330	4.5 x 10 ⁶	7.40

Tabla 1.1: Valores del tiempo de estado de bloqueo y de las constantes de desbloqueo (k_{-b}), bloqueo (k_{+b}), y equilibrio (K_B) para los diferentes fármacos antihelmínticos.

En resumen, la actividad de los canales en presencia de los diferentes antihelmínticos presenta todas las características de un bloqueo de canal abierto. El aumento de la concentración del bloqueador genera una reducción del tiempo de apertura y produce un aumento del área del componente más breve de cierre, así mismo, la duración de este

componente de cierre se mantiene constante a lo largo de las distintas concentraciones de bloqueador.

La afinidad por el sitio de bloqueo en el receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT_{3A} (poro de 5-HT_{3A}) de los distintos fármacos antihelmínticos es: morantel > pirantel > oxantel > levamisol.

2.3 Efecto de las drogas antiparasitarias sobre las corrientes macroscópicas de $\alpha 7$

Continuamos evaluando la eficacia de los antihelmínticos sobre el receptor $\alpha 7$ utilizando la quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A} y registrando corrientes macroscópicas iniciadas con ACh, pirantel, morantel, oxantel y levamisol, todas a una concentración de 500 μ M (Fig. 1.9). Las corrientes se obtuvieron de un mismo sello en la configuración *whole-cell*.

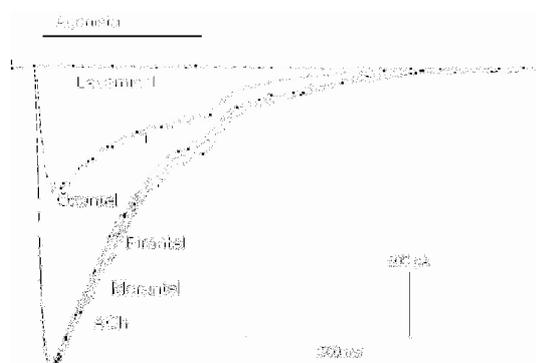


Fig. 1.9: Activación del receptor $\alpha 7$ -5HT_{3A} por ACh y fármacos antihelmínticos. Las corrientes macroscópicas se obtuvieron en la configuración *whole-cell*. Se utilizaron pulsos de 500 ms de agonista 500 μ M. Potencial de membrana: -50 mV.

Como se muestra en la figura 1.9, levamisol no genera ningún tipo de respuesta, de manera similar a lo que se observó previamente en el receptor nACh muscular de mamífero (Rayes et al., 2004). Oxantel produce una respuesta máxima del 54.2 ± 2.5 % de la generada por ACh, indicando que, al igual que levamisol, es un agonista parcial de $\alpha 7$, aunque la eficacia es mayor que este último agente. Por el contrario, tanto pirantel como morantel son capaces de activar al receptor $\alpha 7$ -5HT_{3A}. La amplitud de las corrientes producidas por pirantel y morantel son similares a la generada por ACh en el mismo parche. De la relación entre el pico de la corriente y la concentración de agonista (Fig. 1.10), se obtiene un valor de EC₅₀ de 44.0 ± 3.0 μ M (nH= 2.6 ± 0.4) para pirantel y de 29.0 ± 2.7 μ M (nH= 2.5 ± 0.5) para

morantel (Fig. 1.10). Este valor es 5 y 7 veces menor para pirantel y morantel que el calculado para ACh ($EC_{50\text{ ACh}} = 205 \pm 10 \mu\text{M}$, $nH = 2.4 \pm 0.1$; $p < 0.05$, $n = 6$).

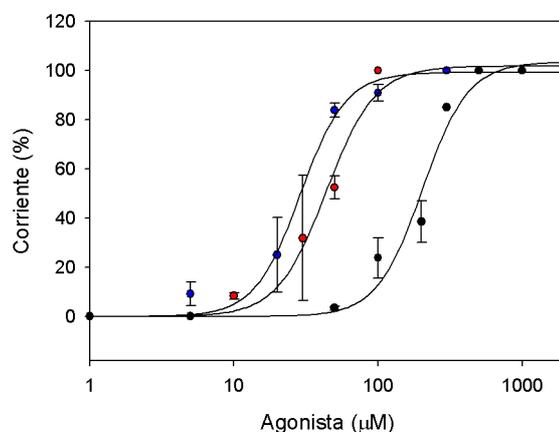


Fig. 1.10: Curvas dosis-respuesta para ACh (negro), pirantel (rojo) y morantel (azul). Cada punto es el promedio de 3 a 5 determinaciones, con el error representando el DS del valor medio. Las curvas fueron ajustadas con la ecuación de Hill (ver Metodología).

Estos resultados sugieren que, a diferencia de la débil activación que generan sobre el receptor nACh muscular de mamífero, pirantel y morantel son agonistas de alta eficacia y más potentes que la ACh en el receptor $\alpha 7$.

Para confirmar que pirantel y morantel son agonistas completos del receptor $\alpha 7$, transfectamos células con el ADNc del receptor $\alpha 7$ salvaje y el de la chaperona Ric-3, y registramos corrientes macroscópicas en la configuración *whole-cell*. En la figura 1.11A mostramos la activación de $\alpha 7$ por ACh (control), morantel (un agonista completo) y oxantel (agonista parcial). Como describimos para el receptor $\alpha 7$ -5HT_{3A}, el pico máximo de las corrientes se reproduce para los distintos agonistas. Además, el EC_{50} de activación de morantel ($9.2 \pm 0.4 \mu\text{M}$) es 6.5 veces menor que el de ACh ($59.4 \pm 3.0 \mu\text{M}$) (Fig. 1.11B), igual que en la quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A}.

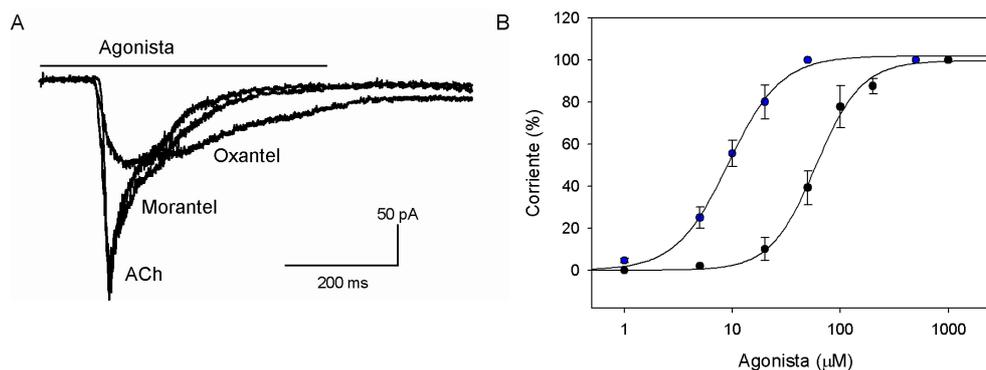


Fig. 1.11: Activación del receptor $\alpha 7$ salvaje por ACh, morantel y oxantel. A: Corrientes macroscópicas obtenidas en la configuración *whole-cell* en respuesta a ACh, morantel u oxantel 500 μM . Potencial de membrana: -50 mV. B: Curvas dosis-respuesta del receptor $\alpha 7$ para ACh (negro) y morantel (azul). Cada punto es el promedio de 3 a 5 determinaciones, con el error representando el DS de cada valor medio. Las curvas se ajustaron con la ecuación de Hill (ver Metodología).

De esta manera, nuestros resultados confirman que morantel y pirantel son agonistas completos del receptor $\alpha 7$ salvaje, oxantel y levamisol son agonistas parciales, y valida el uso de la quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A} como modelo del receptor $\alpha 7$.

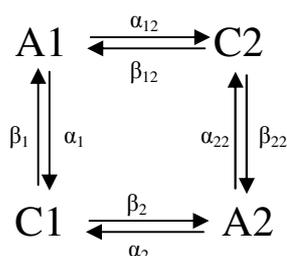
En conjunto, nuestros resultados muestran que levamisol y oxantel son agonistas poco eficaces del receptor $\alpha 7$ (sobre todo levamisol), al igual que en el receptor nACh muscular de mamífero. Pirantel y morantel son agonistas completos y más potentes que la ACh en el receptor $\alpha 7$, a diferencia de la acción en el receptor nACh muscular donde son poco eficaces. Resumiendo, la eficacia de activación del receptor $\alpha 7$ por los fármacos antihelmínticos es: morantel > pirantel > ACh > oxantel >>> levamisol.

2.4 Análisis cinético del receptor $\alpha 7$ activado por pirantel

Mediante el análisis cinético de un receptor podemos obtener los valores de las constantes de apertura y cierre y de esta manera definir la forma de activación del canal. Posteriormente podemos evaluar los cambios de funcionalidad debido a mutaciones y comparar la acción de diversos fármacos sobre el receptor.

La cinética de activación del receptor $\alpha 7$ -5HT_{3A} fue descrita previamente en detalle en nuestro laboratorio (Raya et al., 2005). Este estudio demostró que el análisis de los *bursts* de activación brinda información de la cinética de la quimera. A diferencia del receptor nACh muscular, los tiempos de aperturas y cierres dentro de los *bursts* se mantienen constantes a lo

largo de las distintas concentraciones de ACh testeadas. Los histogramas correspondientes de tiempo de estado abierto y cerrado se ajustan con dos exponenciales, indicando dos tipos de aperturas y cierres (breves y largos) dentro de cada *burst*. Luego de la inspección visual de los registros de canal único, se vio que cada estado podía estar rodeado de los otros dos en cualquier secuencia. Por lo tanto, el mejor esquema que describe la cinética del receptor $\alpha 7$ -5HT_{3A} es uno cíclico con dos estados abiertos y dos cerrados. Cada estado abierto está conectado a dos estados cerrados y viceversa (Esquema 1.2):



Esquema 1.2

donde A1 es el estado abierto breve y A2 el largo, y C1 el estado cerrado breve y C2 el largo, respectivamente. El punto de entrada más probable al esquema sería por C1 ya que es el estado cerrado por el cual el estado abierto más estable (A2) se cierra con mayor probabilidad (Raves et al., 2005), además, si el punto de entrada fuera C2, las aperturas largas raramente ocurrirían, cosa que no es cierta. La actividad de un *burst* finaliza cuando el receptor se desensibiliza. Las velocidades de apertura están dadas por las constantes β , y las de cierre, por las constantes α . Los valores de las constantes se detallan en la Tabla 1.2.

	ACh
$\beta 1$ (s ⁻¹)	10400 ± 1700
$\alpha 1$ (s ⁻¹)	7800 ± 1000
$\beta 2$ (s ⁻¹)	37500 ± 3000
$\alpha 2$ (s ⁻¹)	330 ± 24
$\beta 12$ (s ⁻¹)	1500 ± 120
$\alpha 12$ (s ⁻¹)	6100 ± 760
$\beta 22$ (s ⁻¹)	540 ± 70
$\alpha 22$ (s ⁻¹)	25 ± 3

Tabla 1.2: Velocidades de apertura (β) y cierre (α) obtenidos del ajuste cinético del receptor $\alpha 7$ -5HT_{3A} activado con ACh (Raves et al., 2005).

(Tabla 1.2). Además asumimos que las velocidades de bloqueo y desbloqueo son las mismas para ambos estados abiertos (A1 y A2). De esta manera, obtuvimos los siguientes valores de bloqueo: $k_{+b} = 39 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $k_{-b} = 15400 \text{ s}^{-1}$. Podemos asegurar que estos datos fueron correctamente obtenidos ya que las funciones de densidad de probabilidad resultantes del análisis cinético se ajustan adecuadamente a los histogramas experimentales (Fig. 1.12). De esta forma, el Esquema 1.3 provee una buena descripción del bloqueo antihelmíntico de los canales $\alpha 7\text{-5HT}_{3A}$ activados por ACh.

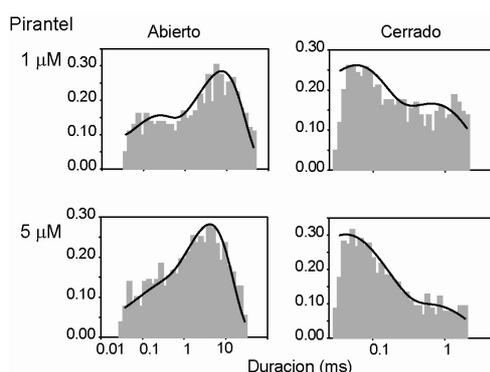


Fig. 1.12: Análisis cinético del receptor $\alpha 7\text{-5HT}_{3A}$ activado por ACh 1 mM y bloqueado por pirantel 1 y 5 μM . Los histogramas de aperturas y cierres se muestran con las funciones de densidad de probabilidad derivadas del ajuste del Esquema 1.3 (curvas negras) a los datos experimentales. Los histogramas se construyeron con los *bursts* seleccionados. Las ordenadas corresponden a la raíz cuadrada de la fracción de eventos por registro.

Luego de obtener los valores de las constantes de bloqueo continuamos estimando las velocidades de apertura y cierre del receptor $\alpha 7\text{-5HT}_{3A}$ activado por pirantel utilizando el Esquema 1.3. Para ello, ahora fijamos las constantes k_{+b} y k_{-b} y dejamos libres las restantes. En esta etapa del análisis utilizamos los datos experimentales de los canales activados por pirantel 10 y 50 μM . Los valores de las distintas velocidades de cierre y apertura obtenidos fueron los siguientes (Tabla 1.3):

	$\alpha 7\text{-5HT}_{3A}$	
	ACh	Pirantel
$\beta 1$ (s^{-1})	10400 ± 1700	10100 ± 1300
$\alpha 1$ (s^{-1})	7800 ± 1000	4400 ± 2000
$\beta 2$ (s^{-1})	37500 ± 3000	38000 ± 5100
$\alpha 2$ (s^{-1})	330 ± 24	450 ± 90.0
$\beta 12$ (s^{-1})	1500 ± 120	1860 ± 470
$\alpha 12$ (s^{-1})	6100 ± 760	0.15 ± 0.10
$\beta 22$ (s^{-1})	540 ± 70	12.0 ± 8.0
$\alpha 22$ (s^{-1})	25 ± 3	19.4 ± 6.0
k_{+b} ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	-	39.0
k_{-b} (s^{-1})	-	15400

Tabla 1.3: Parámetros cinéticos de los canales $\alpha 7\text{-5HT}_{3A}$ activados por ACh y pirantel. Los valores son el resultado de ajustes simultáneos del Esquema 1.2 (ACh) y Esquema 1.3 (pirantel) a los datos de los diferentes parches de cada condición. Se utilizó concentraciones de ACh de 50-500 μM y de pirantel de 10-50 μM . k_{+b} y k_{-b} se construyeron con los valores determinados en presencia de ACh 1 mM.

Comparando los distintos valores cinéticos del receptor activado por ACh o pirantel (Tabla 1.3) podemos ver que la principal diferencia la encontramos en la constante de cierre $\alpha 12$ que va de la apertura breve A1 al cierre largo C2. El hecho de que esta constante sea tan lenta cuando pirantel es el agonista (~40.000 veces más lenta que para ACh) indica que los cierres largos dentro del *burst* ocurren con poca frecuencia. Esto coincide con lo observado en los registros de canal único, donde existen pocos cierres largos dentro de los *bursts* de activación.

Finalmente, como control, quisimos obtener a partir del Esquema 1.3, los valores de las constantes de apertura y cierre del canal activado por ACh pero ahora fijando las constantes de bloqueo, utilizando los valores experimentales obtenidos con ACh 1 mM y pirantel 5 μM . En este análisis, no se observaron cambios en las constantes de activación para ACh con respecto a las obtenidas en ausencia de pirantel. Podemos asegurar entonces que las diferencias en las constantes de activación de pirantel y ACh no surgen del ajuste de los datos a los diferentes esquemas conteniendo (Esquema 1.3) o no (Esquema 1.2) los estados de bloqueo.

3- RESIDUOS INVOLUCRADOS EN LA ACTIVACIÓN DIFERENCIAL DE SUBTIPOS DE nAChRs POR PIRANTEL Y MORANTEL

En este trabajo de Tesis determinamos que los agentes antihelmínticos pirantel y morantel son agonistas completos y más potentes que la ACh en el receptor nACh $\alpha 7$ y son parciales en el receptor nACh muscular adulto de mamífero. A pesar de que oxantel pertenece a la familia de las tetrahidropirimidinas es un agonista parcial en ambos subtipos de receptores al igual que levamisol. Este último es el menos eficaz de los cuatro antihelmínticos aquí estudiados.

Este estudio lo continuamos determinando las bases estructurales de la activación diferencial de pirantel y morantel sobre los receptores nACh utilizando la técnica de mutagénesis dirigida sobre residuos probablemente involucrados del sitio de unión de agonistas.

3.1 El sitio de unión de agonistas

El sitio de unión de agonistas está localizado en el dominio extracelular, en la interfase de dos subunidades adyacentes. Está formado por residuos hidrofóbicos y aromáticos provenientes de cadenas β de las dos subunidades. El lado principal de este sitio, es aportado por subunidades α y el lado complementario por subunidades α en homopentámeros, y no- α en heteropentámeros.

Los residuos del lado principal involucrados en la unión del agonista (Sine, 2002) están altamente conservados entre las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 7$ (Fig. 1.13). Existe menos conservación en el lado complementario. Éste está formado por residuos de la subunidad $\alpha 7$ en el receptor neuronal y de las subunidades ϵ y δ en el receptor nACh muscular (Fig. 1.13).

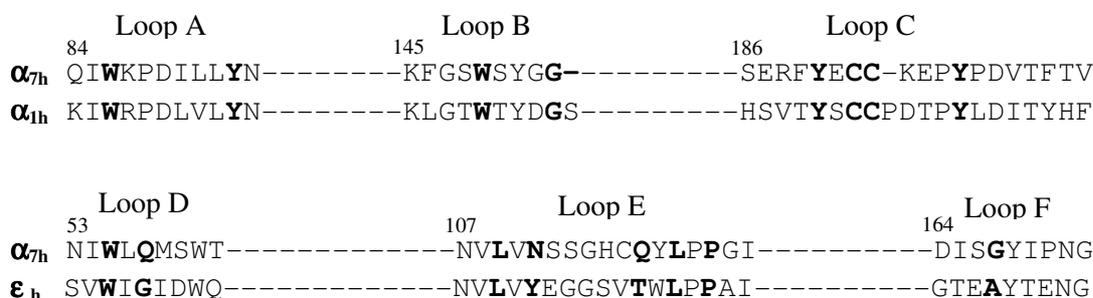


Fig. 1.13: Secuencias alineadas involucradas en la unión de agonistas. Arriba: Secuencias del lado principal de $\alpha 7$ y $\alpha 1$ humanas mostrando en negrita los residuos involucrados en la unión de agonistas. Abajo: Secuencias del lado complementario de $\alpha 7$ y ϵ humanos. Para el alineamiento se utilizó ClustalW (1.81).

3.2 Residuos del lado complementario involucrados en la unión de fármacos antihelmínticos

i) Estudio de los residuos del lado complementario del receptor nACh $\alpha 7$

Para entender a nivel molecular los diferentes modos de activación de pirantel y morantel sobre los subtipos de nAChRs decidimos empezar comparando las secuencias de los sitios de unión de agonistas de los receptores nACh muscular y $\alpha 7$. Como los residuos del lado principal en ambas subunidades α se conservan (Fig. 1.13) focalizamos nuestra atención en el otro lado que compone el sitio de unión. A diferencia del lado principal, algunos de los residuos que participan de la unión del ligando en $\alpha 7$, como Q57, N111, Q117 y G167, no se encuentran conservados en las subunidades ϵ o δ musculares de mamífero (Fig. 1.13). Decidimos entonces mutar estas posiciones en $\alpha 7$ por los residuos homólogos de la subunidad ϵ .

A partir del receptor $\alpha 7$ -5HT_{3A} construimos las siguientes mutantes $\alpha 7$ -Q57G, $\alpha 7$ -N111Y, $\alpha 7$ -Q117T y $\alpha 7$ -G167A, y evaluamos la actividad de los canales iniciada por ACh (control) y agentes antihelmínticos. En la Figura 1.14 vemos a las distintas mutantes activadas con pirantel 50 μ M.

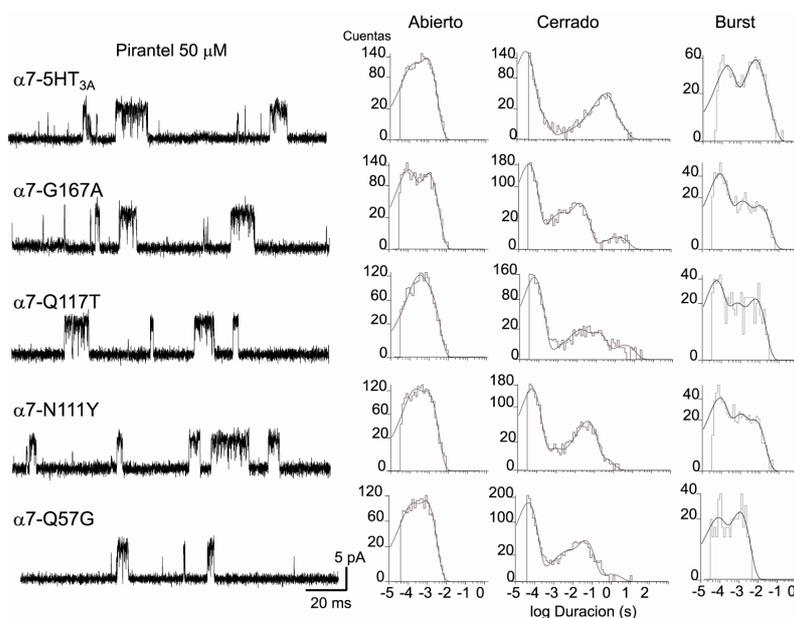


Fig. 1.14: Registros de corrientes unitarias de $\alpha 7$ -5HT_{3A} salvaje y mutado en el lado complementario, activados con pirantel 50 μ M. Izquierda: Trazos de corrientes a -70 mV. Derecha: Histogramas de tiempo de estado abierto, cerrado y de *burst* correspondientes a cada mutación.

La mutante $\alpha 7$ -G167A no presenta cambios ni en la mínima concentración necesaria para detectar corrientes unitarias ni en la propiedad de los canales activados por ACh y antihelmínticos.

Con las mutantes $\alpha 7$ -N111Y y $\alpha 7$ -Q117T la mínima concentración capaz de iniciar corrientes unitarias aumenta tanto para ACh como para antihelmínticos con respecto a la quimera control. En esas mutantes, los canales aparecen a concentraciones de agonistas 2 a 3 veces más altas con respecto al control $\alpha 7$ -5HT_{3A}. Los tiempos de estado abierto y cerrado y la duración del *burst* no cambian en las mutantes con respecto al control para todos los agonistas. Podemos concluir entonces que las mutaciones $\alpha 7$ -N111Y y $\alpha 7$ -Q117T no afectan la cinética del gatillado, ambas producen únicamente una disminución ligera y cuantitativamente similar de la sensibilidad de activación por ACh y antihelmínticos. Estos residuos no contribuyen a la activación diferencial de morantel y pirantel sobre subtipos de receptores nACh.

Cuando reemplazamos la glutamina de la posición 57 de $\alpha 7$ por glicina (residuo equivalente de la subunidad ϵ) las eficacias de activación del receptor $\alpha 7$ -5HT_{3A} por pirantel y morantel disminuyen significativamente. A nivel de canal único, las aperturas se observan a concentraciones mayores de 50 μ M de pirantel (en lugar de 10 μ M; Fig. 1.14) y de 20 μ M de morantel (en lugar de 5 μ M; Fig. 1.15). A esas concentraciones, la duración y el área del componente más lento del histograma de tiempo de estado abierto son similares a las de la quimera sin mutar ($810 \pm 30 \mu$ s (0.64 ± 0.01) y $800 \pm 90 \mu$ s (0.73 ± 0.02), para la mutante y el control activados con pirantel 50 μ M, Fig. 1.14; y $850 \pm 100 \mu$ s (0.70 ± 0.05) y $995 \pm 90 \mu$ s (0.72 ± 0.06), para la mutante y el control activados con morantel 20 μ M, Fig. 1.15). La similitud de los tiempos se debería al efecto del bloqueo del canal abierto a esas concentraciones.

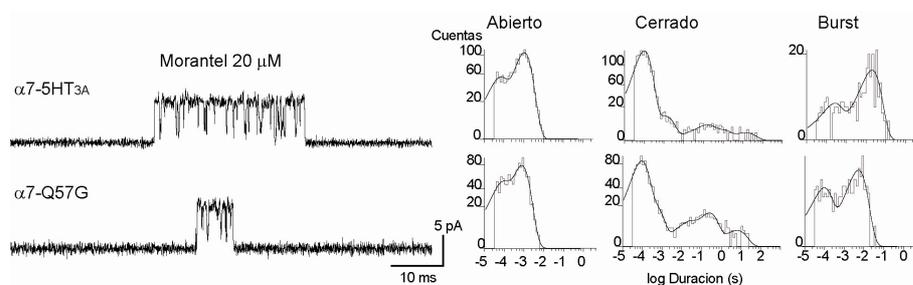


Fig. 1.15: Activación del receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT_{3A} sin mutar y mutado (Q57G) con morantel 20 μ M. Izquierda: Registros de canales obtenidos en la configuración *cell-attached* a un potencial de membrana de -70 mV. Derecha: Histogramas de tiempo de estado abierto, cerrado y de *burst* para cada receptor.

La duración de los *bursts* de aperturas en el receptor mutado es 3 veces menor que en el salvaje para pirantel (4.1 ± 0.4 ms y 11.6 ± 2.0 ms para la mutante y el receptor control de $\alpha 7$ -5HT_{3A}, respectivamente, a pirantel 50 μ M) y 4 veces menor para morantel (6.0 ± 0.1 ms y 22.3 ± 2.7 ms para el receptor mutado y el salvaje, respectivamente, a morantel 20 μ M). La disminución en los tiempos de *bursts* es acompañada por una reducción en el número de aperturas por *burst*, 6.5 ± 0.2 y 20.5 ± 0.9 eventos por *burst* para la quimera mutada y sin mutar, activados con pirantel 50 μ M; y 7.5 ± 1.0 y 22.0 ± 5.5 eventos por *burst* para la quimera mutada y salvaje, activados con morantel 20 μ M, respectivamente. Para descartar que los *bursts* breves que se observan en el receptor mutado $\alpha 7$ -Q57G sean aperturas aisladas bloqueadas por pirantel, registramos canales a un potencial de membrana positivo (+70 mV). A este potencial de membrana se reduce significativamente el bloqueo del canal. A pesar de esto, las aperturas siguen siendo en forma de *bursts*.

De manera opuesta a los efectos producidos por pirantel y morantel, no observamos cambios en la activación de $\alpha 7$ -Q57G por oxantel. Al igual que para la quimera control (sin mutar), detectamos canales a una concentración mínima de oxantel de 50 μ M. No detectamos cambios ni en el tiempo medio de estado abierto ($\tau_1 = 1.00 \pm 0.15$ ms, $\tau_2 = 126 \pm 70$ μ s) ni en la duración del *burst* (5.7 ± 0.6 ms).

Cuando examinamos la activación del receptor mutado en la posición Q57G con levamisol, sólo detectamos canales en el 10-20 % de los parches de las células transfectadas, similar a lo que observábamos en la quimera control. Como la actividad de canales detectada en el receptor $\alpha 7$ activado con levamisol es muy baja no pudimos determinar si esta posición afecta la activación por levamisol.

Cuando evaluamos la activación por ACh del receptor $\alpha 7$ -Q57G-5HT_{3A}, no observamos diferencias ni en la mínima concentración requerida para detectar canales únicos, ni en el tiempo de estado abierto, cerrado o de *burst* con respecto a la quimera sin mutar. A una concentración de ACh de 500 μ M, las duraciones y áreas relativas de los componentes de aperturas son: $\tau_1 = 6.50 \pm 0.80$ ms (0.25 ± 0.01), $\tau_2 = 0.80 \pm 0.50$ ms (0.16 ± 0.05), y $\tau_3 = 90 \pm 10$ μ s (0.56 ± 0.02), y la duración del *burst* es de 14.3 ± 6.4 ms.

Estos resultados parciales a nivel de canal único muestran que la mutación Q57G en el receptor nACh $\alpha 7$ altera selectivamente la activación de pirantel y morantel.

Para determinar los cambios globales en la activación del receptor mutado $\alpha 7$ -Q57G-5HT_{3A} por pirantel y morantel medimos corrientes macroscópicas (Fig. 1.16). Los registros

revelan una disminución selectiva y significativa de la eficacia de pirantel y morantel con respecto a la quimera control. Los picos de las corrientes generados por concentraciones saturantes (500 μM) de antihelmínticos son de 61.0 ± 4.0 y 48.0 ± 8.2 % para pirantel y morantel, respectivamente, con respecto al de ACh 500 μM . Una disminución similar en el pico de la corriente se observó a un potencial fuertemente positivo, +100 mV (Fig. 1.16A). A este potencial, el efecto de bloqueo del poro pasa desapercibido (Neher and Steinbach, 1978; Rayes et al., 2004). Esta observación junto con el hecho de que la reducción en el pico de la corriente por el bloqueo del canal no se observó en la quimera control con pirantel o morantel 500 μM (Fig. 1.9), indica que la reducción en la máxima respuesta es originada de una eficacia reducida y no del bloqueo del canal.

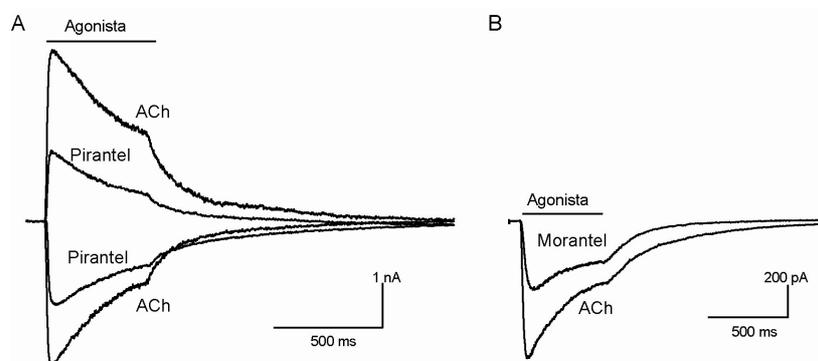


Fig. 1.16: Corrientes macroscópicas del receptor $\alpha 7$ -Q57G-5HT_{3A} activado por ACh, pirantel y morantel. A: Corrientes obtenidas en la configuración *whole-cell* en respuesta a ACh o pirantel 500 μM a -50 y +100 mV. B: Corrientes activadas por ACh o morantel 500 μM a -50 mV. La barra sólida indica la duración de la exposición al agonista.

De la relación que surge de graficar el porcentaje de corriente versus la concentración de agonista se puede obtener un valor de EC_{50} , que corresponde a la concentración necesaria para alcanzar el 50 % de la respuesta máxima. El valor de la pendiente, que corresponde al coeficiente de Hill (nH), es una medida de la cooperatividad de las distintas subunidades al gatillado del canal. El EC_{50} de pirantel y morantel, calculado de la curva dosis-respuesta, es dos veces más alto que el de la quimera control (77 ± 4.0 μM en lugar de 44 ± 3.0 μM para pirantel y 54 ± 4.8 μM en lugar de 29 ± 2.7 μM para morantel, en la mutante comparado con el control respectivamente, Fig. 1.17). Para pirantel, el coeficiente de Hill disminuye de 2.6 ± 0.4 (quimera control) a 1.8 ± 0.1 en la quimera mutante. Para morantel, también disminuye de 2.7 ± 0.2 a 2.0 ± 0.1 ($p < 0.05$, $n = 4$). Esto indica un deterioro del gatillado del canal (Colquhoun, 1998). Por el contrario, ni el EC_{50} (220 ± 20 μM) ni el coeficiente de Hill (2.34

± 0.4) cambian para ACh. Como en la quimera control, levamisol no es capaz de iniciar corrientes en la quimera mutada en Q57G y oxantel genera el mismo porcentaje de respuesta que en el receptor sin mutar.

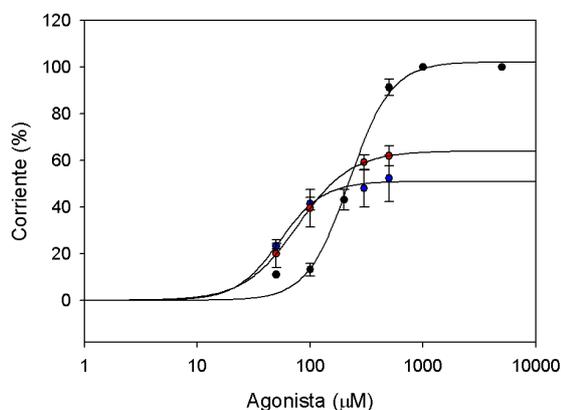


Fig. 1.17: Curvas dosis-respuesta para ACh (negro), pirantel (rojo) y morantel (azul). Cada punto es el promedio de 3 a 5 determinaciones con las barras representado al error como DS. Las curvas se ajustaron con la ecuación de Hill (ver Metodología).

En conclusión, la mutación Q57G en el receptor nACh $\alpha 7$ no afecta la activación por ACh (control), oxantel o levamisol, pero significativamente disminuye la potencia y la eficacia de activación de pirantel y morantel. Esta posición está diferencialmente conservada entre subunidades del lado complementario, pero cada subunidad está conservada entre especies. Es una glutamina (Q) en subunidades ϵ de mamíferos, ácido glutámico (E) en subunidades γ y ácido glutámico o aspártico (E o D) en subunidades δ . Por lo tanto, si en esta posición encontramos una glutamina, como en el receptor nACh $\alpha 7$, pirantel y morantel se comportan como agonistas completos. En cambio, si existe una glicina, como en la subunidad ϵ muscular, ambos antihelmínticos actúan como agonistas parciales. Estos resultados indican que la posición 57, ubicada en el lado complementario del sitio de unión de agonistas de los receptores nACh, es uno de los determinantes principales de la selectividad diferencial de pirantel y morantel entre los receptores nACh $\alpha 7$ y musculares de mamíferos.

ii) Análisis cinético del receptor nACh $\alpha 7$ portando la mutación Q57G

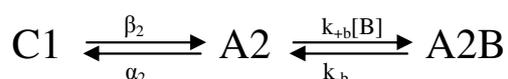
Para analizar la cinética de activación del receptor mutado $\alpha 7$ -Q57G-5HT_{3A} primero realizamos el ajuste del Esquema 1.2 (sin los estados de bloqueo) para ACh y luego el ajuste del esquema 1.3 (con los estados de bloqueo) para el fármaco pirantel.

Como era esperable, luego del análisis de los datos de las corrientes macroscópicas y unitarias, no se observaron cambios en los valores de las constantes de activación de ACh entre la quimera control y la mutante (Tablas 1.3 y 1.4). En cambio, el análisis cinético de la mutante activada por pirantel (Tabla 1.4) revela importantes diferencias en las constantes estimadas respecto al receptor control (Tabla 1.3).

	$\alpha 7$-Q57G-5HT_{3A}	
	ACh	Pirantel
$\beta 1$ (s ⁻¹)	9400 ± 820	2.50 ± 1.80
$\alpha 1$ (s ⁻¹)	5800 ± 420	25.0 ± 12.0
$\beta 2$ (s ⁻¹)	22750 ± 1990	50000 ± 10000
$\alpha 2$ (s ⁻¹)	170 ± 20.0	970 ± 470
$\beta 12$ (s ⁻¹)	1130 ± 115	1630 ± 800
$\alpha 12$ (s ⁻¹)	5500 ± 940	26.0 ± 14.0
$\beta 22$ (s ⁻¹)	1130 ± 130	1.20 ± 0.90
$\alpha 22$ (s ⁻¹)	56.0 ± 6.0	62.0 ± 36.0
k_{+b} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	-	39.0
k_{-b} (s ⁻¹)	-	15400

Tabla 1.4: Parámetros cinéticos de los canales del receptor $\alpha 7$ -Q57G-5HT_{3A} activados por ACh y pirantel. Concentraciones de pirantel: 50-80 μM y de ACh: 50-500 μM .

Los principales cambios en las constantes de activación debidos a la mutación Q57G se observan en los valores de $\beta 1$ y $\alpha 1$, las cuales son ~4000 y ~180 veces menores que los obtenidos con la quimera control (Tablas 1.3 y 1.4). Además cuando el receptor alcanza el estado abierto largo A2, tiende a cerrarse al estado cerrado breve C1 antes que el C2 ya que la velocidad del primero es 15 veces mayor; o a bloquearse al estado A2B. De esta manera, el esquema cíclico puede ser simplificado por uno lineal (Esquema 1.4), con un estado cerrado breve (C1), uno abierto largo (A2), y uno bloqueado (A2B). Entonces, cuando $\alpha 7$ -Q57G-5HT_{3A} es activado por pirantel, el receptor se abre a un único estado abierto, en lugar de oscilar entre los dos estados abiertos como ocurre con el receptor no mutado.



Esquema 1.4

Para pirantel, el histograma de tiempo de estado abierto construido con los *bursts* seleccionados para el análisis cinético muestra un componente principal con un área mayor a 0.98 (Fig. 1.18). En base a este esquema, podemos explicar la reducción en el número de aperturas por *burst* (de 20.5 ± 0.9 en el receptor control a 6.5 ± 0.2 en el mutado, activados con pirantel $50 \mu\text{M}$) por la ausencia del segundo componente de apertura. Así, el receptor en lugar de oscilar por los distintos estados, lo haría, en presencia de la mutación, sólo por los tres mostrados en el Esquema 1.4. De esta manera, el *burst* que termina por desensibilización lo haría desde el estado abierto más largo (A2). Otra explicación factible de la reducción del tiempo de burst sería un aumento en las constantes de disociación, pero estas constantes no pueden medirse por análisis cinético (Raya et al., 2005).

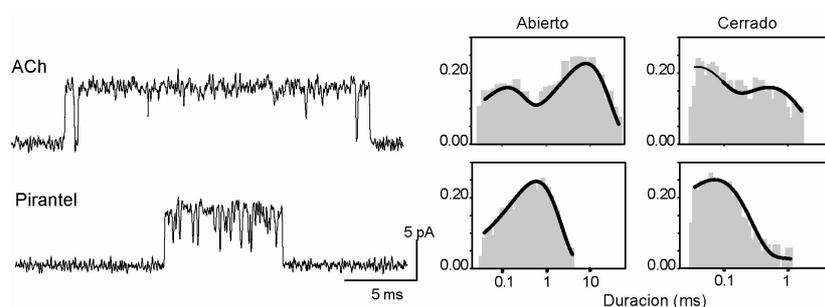


Fig. 1.18: Receptor $\alpha 7$ -Q57G-5HT_{3A} activado por ACh y pirantel. Izquierda: Canales registrados en presencia de ACh $50 \mu\text{M}$ o pirantel $60 \mu\text{M}$. Derecha: Histogramas de tiempo de estado abierto y cerrado con las funciones de densidad de probabilidad (curvas oscuras) derivadas del ajuste del Esquema 1.2 (ACh) o del Esquema 1.3 (pirantel) a los datos experimentales. Los histogramas se construyeron con los *bursts* seleccionados. Las ordenadas corresponden a la raíz cuadrada de la fracción de eventos totales.

iii) Estudio de residuos del lado complementario del receptor nACh muscular

Mostramos que el reemplazo de la glutamina 57 del receptor $\alpha 7$ por glicina, encontrada en la subunidad ϵ muscular, reduce la eficacia de activación de pirantel y morantel. Por lo tanto, hipotetizamos que la mutación reversa en el receptor nACh muscular incrementaría la eficacia de ambos antihelmínticos. Para testear esta hipótesis, sustituimos en las subunidades

δ y ϵ el residuo de la posición 57 por glutamina. Generamos receptores musculares con las subunidades mutadas δ D57Q y ϵ G57Q y evaluamos la activación de éstos por ACh y fármacos antihelmínticos.

En la figura 1.19 mostramos la activación del receptor nACh muscular adulto de mamífero mutado y sin mutar en la posición 57 por morantel 1 μ M.

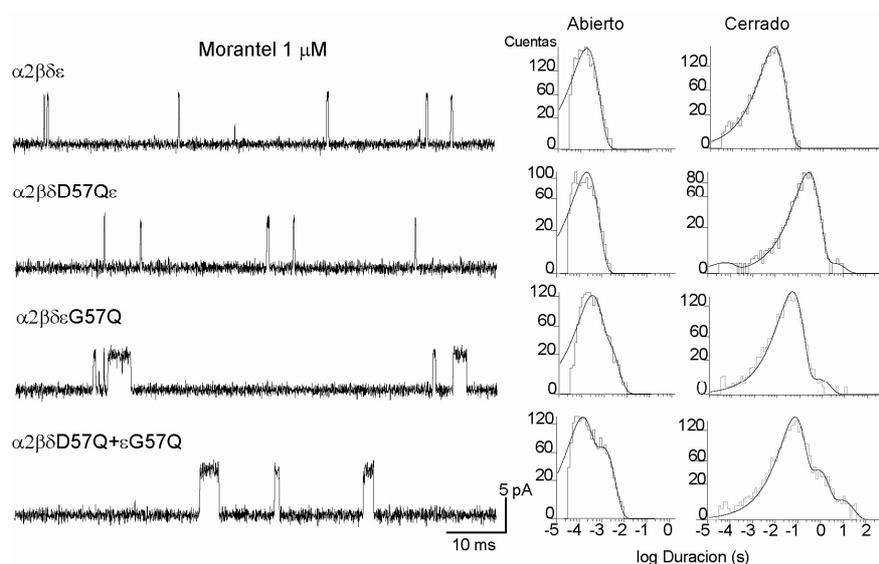


Fig. 1.19: Activación del nAChR muscular salvaje ($\alpha 2\beta\delta\epsilon$) y mutado por morantel 1 μ M. Izquierda: Trazos de corrientes unitarias a -70 mV. Derecha: Histogramas de tiempo de estado abierto y cerrado correspondiente a cada receptor.

Cuando el receptor nACh muscular adulto porta la mutación δ D57Q, permanecen idénticas a las del receptor sin mutar, la mínima concentración de pirantel y morantel para detectar canales (1 μ M), y las propiedades de canal único (Fig. 1.19). Tampoco se observan cambios en la activación de ACh, oxantel o levamisol.

Cuando glicina es reemplazada por glutamina en la subunidad ϵ (ϵ G57Q), las eficacias de pirantel y morantel aumentan significativamente con respecto al receptor nACh muscular salvaje. Los registros de canal único se detectan a concentraciones tan bajas como 0.25 μ M en vez de 1.0 μ M. A esa concentración, los histogramas de tiempo de estado abierto se ajustan con dos componentes. El más largo tiene una duración aproximada de 1 ms, similar al de ACh en el receptor salvaje. A una concentración de morantel de 1 μ M, el histograma de tiempo de estado abierto se ajusta con dos componentes de tiempos y áreas relativas: $\tau_1 = 1.00 \pm 0.30$ ms (0.35 ± 0.10) y $\tau_2 = 155 \pm 50$ ms (0.65 ± 0.15) (Fig. 1.19). En concentraciones saturantes (300 μ M) de pirantel y morantel, la activación es en forma de *clusters* aunque de

baja probabilidad de apertura comparados con los de ACh ($P_{\text{open}} \sim 0.1$ para morantel o pirantel y 0.9 para ACh 300 μM , respectivamente).

No se encontraron diferencias con respecto al receptor salvaje en la propiedad de los canales cuando el receptor mutado en ϵG57Q se activó con ACh. A una concentración de ACh 1 μM , el tiempo medio de estado abierto y las áreas relativas son 0.94 ± 0.05 ms (0.50 ± 0.05) y 260 ± 0.02 μs (0.48 ± 0.02). Tampoco se encontraron cambios en la activación por oxantel o levamisol ($\tau \sim 250$ μs a concentraciones de agonista de 1 μM).

Estos resultados indican que la mutación ϵG57Q en el receptor nACh muscular adulto aumenta selectivamente la eficacia de activación de pirantel y morantel.

Los canales registrados de la doble mutante ($\delta\text{D57Q} + \epsilon\text{G57Q}$) activados por ACh y antihelmínticos presentaron las mismas propiedades que la simple mutante ϵG57Q . Se observó un incremento de la activación tanto para pirantel como para morantel. Por ejemplo, a morantel 1 μM los tiempos y áreas relativas fueron $\tau_1 = 1.0 \pm 0.12$ ms (0.26 ± 0.10) y $\tau_2 = 150 \pm 20$ μs (0.74 ± 0.10) (Fig 1.19). Para ACh, oxantel y levamisol tampoco se observaron cambios con respecto al receptor salvaje.

Finalmente, medimos corrientes macroscópicas del receptor nACh mutado en ϵG57Q . En la Figura 1.20 mostramos al AChR muscular activado con ACh y morantel 100 μM . La amplitud de la corriente iniciada por morantel 100 μM es del 42.0 ± 5.0 % comparada con la generada por ACh 100 μM . La falta de reversión total indica que otros residuos están involucrados en la activación diferencial de los agentes antihelmínticos pirantel y morantel.

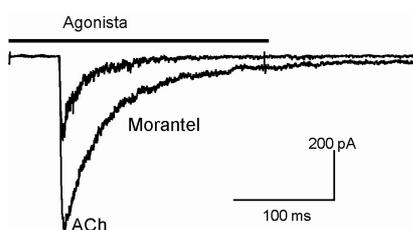


Fig 1.20: Corrientes macroscópicas del receptor nACh muscular mutado en ϵG57Q activadas con ACh o morantel 100 μM en la configuración *outside-out*. Potencial de membrana: -50 mV.

En conjunto, estos resultados indican que el aminoácido de la posición 57, localizado en el lado complementario del sitio de unión de agonistas, es uno de los determinantes principales de la selectividad diferencial de pirantel y morantel para activar subtipos de

receptores nACh. Sin embargo, más residuos son necesarios para revertir completamente los efectos.

3.3 Residuos del lado principal que participan de la unión de las drogas antiparasitarias

En estudios previos demostramos que la mutación de la posición G153, altamente conservada en las subunidades $\alpha 1$ de mamífero, por el residuo equivalente de subunidades α de nematodos (ácido glutámico), aumenta la eficacia de levamisol para activar al receptor nACh muscular de mamífero (Rayes et al., 2004). Por lo tanto, examinamos cómo esta posición está involucrada en la activación de $\alpha 7$ por antihelmínticos, utilizando la quimera de alta conductancia $\alpha 7$ -5HT_{3A}.

En la Figura 1.21 se muestran los canales obtenidos en la configuración *cell-attached* del receptor $\alpha 7$ -G153E-5HT_{3A} activados con la mínima concentración de agonista necesaria para detectar actividad.

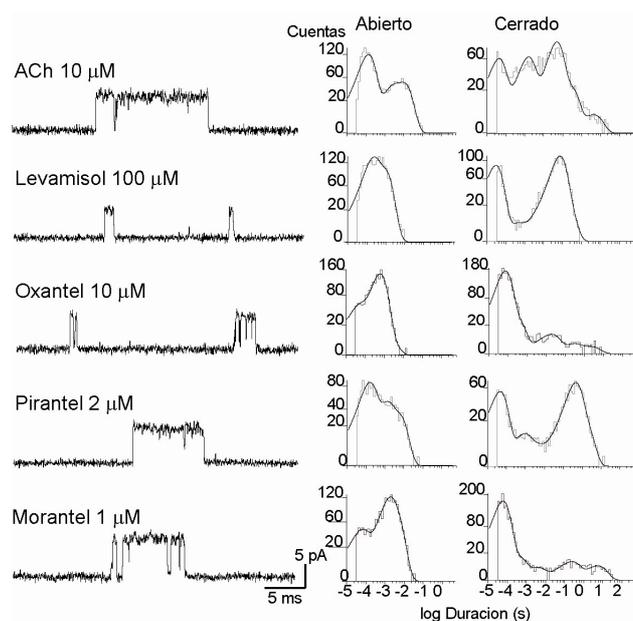


Fig. 1.21: Corrientes de canal único de $\alpha 7$ -5HT_{3A} portando la mutación G153E. Izquierda: Registros de canales activados por ACh, levamisol, oxantel, pirantel y morantel a las concentraciones indicadas. Derecha: Histogramas de tiempo de estado abierto y cerrado correspondientes a cada condición. Potencial de membrana: -70 mV.

Las corrientes unitarias del receptor $\alpha 7$ -5HT_{3A} mutado en G153, activadas por antihelmínticos se detectan a concentraciones 5 veces menores que las requeridas para activar al receptor control (Fig. 1.21). Para ACh, la mínima concentración necesaria para detectar

canales disminuye 3 veces (10 μ M). Los componentes del histograma de tiempo de estado abierto son similares a los de la quimera control ($\tau_1 = 6.80 \pm 0.20$ ms, $\tau_2 = 0.40 \pm 0.20$ ms, $\tau_3 = 110 \pm 20$ μ s). Por el contrario, el tiempo más lento del histograma de aperturas para los diferentes antihelmínticos aumenta ya que a menores concentraciones de estas drogas existe menor efecto de bloqueo de canal abierto. Estos tiempos son de 795 ± 120 μ s para levamisol 100 μ M, 1.78 ± 0.80 ms para oxantel 10 μ M, 5.10 ± 0.71 ms para pirantel 2 μ M y 5.15 ± 0.05 ms para morantel 1 μ M (Fig. 1.21).

De esta manera, en el receptor $\alpha 7$, la mutación G153E localizada en el lado principal del sitio de unión de agonistas afecta la activación de ACh y de todos los antihelmínticos, aunque los cambios son más pronunciados para estos últimos. Por el contrario, la posición Q57 del lado complementario, no contribuye a la activación de ACh, oxantel o levamisol pero significativamente afecta la activación por pirantel y morantel.

3.4 Análisis a nivel de canal único del receptor portando mutaciones en el lado principal y complementario

Para explorar la contribución de las dos mutaciones en forma simultánea en ambos lados del sitio de unión de agonistas, activamos la doble mutante Q57G-G153E en $\alpha 7$ -5HT_{3A} con ACh y fármacos antihelmínticos.

Para ACh y los antihelmínticos oxantel y levamisol, la mínima concentración necesaria para detectar corrientes unitarias así también como las propiedades de los canales, son las mismas que en la mutante simple $\alpha 7$ -G153E-5HT_{3A}. A una concentración de ACh 10 μ M, los tiempos de estado abierto no varían ($\tau_1 = 6.80 \pm 0.40$ ms, $\tau_2 = 0.50 \pm 0.20$ ms y $\tau_3 = 74 \pm 11$ μ s). Cuando activamos la doble mutante con oxantel (10 μ M) o levamisol (100 μ M), la distribución de los tiempos de estado abierto son similares a los obtenidos con la mutante simple $\alpha 7$ -G153E-5HT_{3A}. Estos resultados nuevamente demuestran que el residuo de la posición 57 no contribuye a la activación de ACh, oxantel o levamisol.

El comportamiento de pirantel y morantel en la doble mutante Q57G-G153E es intermedio entre la mutante simple $\alpha 7$ -Q57G-5HT_{3A} (donde la eficacia de activación disminuye para ambos) y $\alpha 7$ -G153E-5HT_{3A} (donde la eficacia de activación aumenta). La mínima concentración requerida para detectar canales únicos es 10 μ M para pirantel y 5 μ M para morantel. La distribución de los tiempos de estado abierto es, para pirantel 10 μ M: $\tau_1 =$

2.30 ± 0.50 ms (0.46 ± 0.10) y $\tau_2 = 90 \pm 5.0$ μ s (0.57 ± 0.05), y para morantel 5 μ M: $\tau_1 = 2.35 \pm 0.15$ ms (0.65 ± 0.02) y $\tau_2 = 75 \pm 20$ μ s (0.34 ± 0.02), similar al receptor salvaje sin mutar.

En conjunto, nuestros experimentos demuestran que la posición 153, localizada en el lado principal del sitio de unión de agonistas, está involucrada en la activación de ACh y fármacos antihelmínticos, mientras que la posición 57, ubicada en el lado complementario, está involucrada sólo en la activación de pirantel y morantel, y es por lo tanto un sitio de selectividad diferencial.

DISCUSIÓN

A lo largo de esta sección discutiré la acción de los fármacos antihelmínticos sobre dos subtipos de receptores nACh, el muscular adulto y el neuronal $\alpha 7$. Como modelo de este último utilizamos al receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT_{3A}. Esta quimera de alta conductancia nos permite detectar corrientes a nivel de canal único y tiene una cinética de activación caracterizada en detalle (Rayes et al., 2005). Además discutiré las bases de la selectividad diferencial de los antihelmínticos por subtipos de receptores nACh y de la generación de resistencia a estas drogas.

El control de la infección por parásitos, tanto en animales como en humanos, se realiza con fármacos antihelmínticos. Estas drogas actúan sobre los receptores nACh de helmintos, generando una apertura prolongada de los canales, contracción permanente de los músculos y muerte por parálisis espástica. Los subtipos de nAChRs de gusanos se clasifican de acuerdo a sus propiedades farmacológicas. En *C. elegans*, los receptores se clasifican de acuerdo a la sensibilidad a levamisol, como L-AChRs, o a nicotina como N-AChRs (Culetto et al., 2004). Aunque se han identificado numerosas subunidades de los dos subtipos (Boulin et al., 2008), queda establecer la correcta estequiometría y la cinética de activación. En *Ascaris* la clasificación es un poco más compleja, ya que a los receptores se los clasifica en tres subtipos: L-AChRs, sensibles a levamisol y pirantel; N-AChRs, sensibles a nicotina y oxantel; y los B-AChRs sensibles a befenium (Martin et al., 2004).

En mamíferos, los fármacos antihelmínticos pueden actuar como agonistas parciales, completos o como moduladores alostéricos dependiendo del subtipo de receptor nACh. En los últimos años determinamos que los antihelmínticos (pirantel, morantel, oxantel y levamisol) son agonistas parciales del receptor nACh adulto de mamífero (Rayes et al., 2001; Rayes et al., 2004; Bartos et al., 2009b) y que los agentes pirantel y morantel son agonistas completos y más potentes que la ACh en el receptor nACh $\alpha 7$ (Bartos et al., 2006a; Bartos et

al., 2009b). Además, morantel (Wu et al., 2008) y levamisol (Levandoski et al., 2003) son moduladores alostéricos positivos de los receptores neuronales $\alpha 3\beta 2$ y $\alpha 3\beta 4$, respectivamente. Con el fin de entender las bases moleculares de tales diferencias, decidimos explorar el sitio de unión de agonistas, focalizándonos en aquellos residuos diferencialmente conservados. La posición 57, localizada en el lado complementario, es responsable en parte de la activación diferencial de los agentes pirantel y morantel sobre subtipos de receptores nACh (Bartos et al., 2006a; Bartos et al., 2009b) y posiblemente esté involucrada en la resistencia de nematodos a fármacos antihelmínticos (Martin and Robertson, 2007). Es interesante notar que el mismo sitio juega un rol crítico en la interacción de los insecticidas neonicotinoides sobre $\alpha 7$, y estaría involucrado en la acción selectiva de estos compuestos sobre los receptores nACh de insecto (Shimomura et al., 2002).

En numerosas enfermedades neurológicas y desordenes psiquiátricos, tales como Alzheimer, déficit de atención, esquizofrenia, entre otros (Kalamida et al., 2007), se encuentra involucrado el receptor nACh $\alpha 7$. El tratamiento de dichas enfermedades consiste, en muchos casos, en incrementar la actividad de $\alpha 7$. El estudio farmacológico de nuevas drogas junto con el descubrimiento de determinantes moleculares de selectividad proveen información para el progreso de la farmacología.

Acción de los antihelmínticos sobre el receptor nACh muscular adulto de mamífero

Los antihelmínticos pirantel y levamisol son agonistas parciales del receptor nACh muscular adulto de mamífero (Rayes et al., 2001; Rayes et al., 2004). Otros dos fármacos más, morantel y oxantel, pertenecientes junto con pirantel a la familia de las tetrahidropirimidinas, actúan como agonistas poco eficaces del receptor nACh muscular (Bartos et al., 2009b).

La débil activación del receptor nACh muscular por morantel u oxantel se refleja por: la presencia de canales con tiempos de estado abierto 4-veces más breves en comparación con el de ACh (~ 1 ms) (Bouzat et al., 2000); la ausencia de *clusters* de activación por morantel a todas las concentraciones testeadas o la presencia de los mismos, pero con muy baja probabilidad de apertura, generados por oxantel en concentraciones saturantes ($P_{\text{apertura}} \sim 0.1$ en lugar de 0.9 con ACh 300 μM) (Bouzat et al., 2000); la activación de corrientes macroscópicas 7- y 16-veces menores para oxantel y morantel, respectivamente, en comparación con las obtenidas por ACh a la misma concentración; y el fuerte efecto de bloqueo del poro cuando se encuentra en estado conductor. La caracterización del bloqueo se

realizó utilizando el típico esquema lineal (Esquema 1.1). La constante de equilibrio para el bloqueo (K_B) es 7 veces menor para morantel comparado con oxantel.

De acuerdo a la magnitud de la respuesta, un agonista puede ser completo o parcial. Los agonistas completos son capaces de iniciar una respuesta máxima, mientras que los parciales sólo generan una parte de ésta, aunque todos los sitios de unión del agonista se encuentren ocupados. Varias teorías tratan de explicar la parcialidad de la respuesta. La tradicional establece que los agonistas parciales tienen mayor afinidad por el estado cerrado que por el abierto que un agonista completo, por lo tanto permanece poco tiempo en el estado abierto generando respuestas cortas (DEL CASTILLO L. and Katz, 1957; Hogg and Bertrand, 2007). Actualmente surgió una nueva teoría donde se incorpora un nuevo estado conformacional entre el estado cerrado y el abierto (Lape et al., 2008). Este estado pre-abierto se conoce como *flip*. En este modelo, cuando un agonista parcial se une al receptor produce una respuesta menor porque la velocidad del estado cerrado ligado al pre-abierto es menor que la de un agonista completo. Una vez que el canal alcanza este estado pre-abierto, las aperturas ocurren con la misma velocidad, independientemente de que sea un agonista parcial o completo (Lape et al., 2008).

En conclusión, por su débil activación junto con el efecto de bloqueo de canal abierto los fármacos antihelmínticos son agonistas parciales del nAChR muscular adulto de mamífero.

Efecto de los fármacos antihelmínticos sobre el receptor nACh $\alpha 7$

Los agentes antihelmínticos levamisol y oxantel actúan como agonistas parciales del receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT_{3A}. La parcialidad para levamisol es aún mayor que para oxantel ya que las aperturas de los canales se producen a concentraciones tan altas como 500 μ M, son esporádicas y breves. Además, no es capaz de generar corrientes macroscópicas en ninguna de las concentraciones testeadas. Oxantel a pesar de que necesita una concentración mayor que la mínima para detectar corrientes unitarias que ACh, logra activar al receptor en forma de *bursts* de corta duración y las corrientes macroscópicas alcanzan el 50 % de la obtenida por ACh. De esta manera, ambos fármacos se comportan como agonistas débiles en $\alpha 7$, al igual que en el receptor nACh muscular adulto.

Este es el primer reporte que muestra que pirantel y morantel son agonistas completos y más potentes que la ACh en el receptor nACh $\alpha 7$. Los resultados experimentales que apoyan estas conclusiones son los siguientes: i) se obtuvieron, con estos dos antihelmínticos,

corrientes macroscópicas con amplitudes máximas similares a las obtenidas por ACh; ii) la curva dosis-respuesta para ambos agentes está desplazada hacia concentraciones menores de agonista indicando una potencia de activación mayor que para ACh; iii) la mínima concentración capaz de detectar corrientes unitarias es 3 y 6 veces menores para pirantel y morantel, respectivamente, que ACh; y iv) el análisis cinético reveló constantes de activación similares en $\alpha 7$ -5HT_{3A} para pirantel y ACh.

Confirmamos que la quimera es un modelo útil del receptor nACh $\alpha 7$, cuando obtuvimos corrientes macroscópicas activadas con ACh y fármacos antihelmínticos del mismo orden que las obtenidas en el receptor $\alpha 7$ -5HT_{3A}.

De los antihelmínticos utilizados en este trabajo de Tesis, levamisol pertenece a la familia de los imidazotiazoles y el resto a la de las tetrahidropirimidinas. Levamisol es el agonista más parcial de todos en los dos receptores estudiados. Los otros tres antihelmínticos tienen en común un anillo metil-tetrahidropirimidina y difieren en el otro grupo, que es un tiofeno en pirantel, un metil-tiofeno en morantel y un oxifenol en oxantel (Fig. 1.1). El anillo tiofeno, metilado o no, es el que le aporta carácter de agonista completo a la molécula. Este heterociclo interaccionaría con el residuo de la posición 57 del lado complementario del sitio de unión de agonistas (ver estudios *in silico*). A pesar de esto, morantel presenta un EC₅₀ y una K_B menores que pirantel. Podemos inferir entonces, comparando la estructura de ambas moléculas (Fig. 1.1), que el metilo adicional de morantel incrementaría ligeramente la potencia de esta molécula ya que este grupo podría estar interaccionando con más residuos del sitio de unión y aumentaría el bloqueo estérico sobre el poro del receptor.

Cinética de activación del receptor $\alpha 7$ -5HT_{3A} por pirantel

Los canales del receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT_{3A} activados por ACh aparecen como aperturas simples rodeadas por cierres largos o en forma de *burst*. Los *bursts* de activación consisten en varias aperturas sucesivas separadas por tiempos menores que el tiempo crítico (Rayes et al., 2005). Los *bursts* iniciados por concentraciones saturadas de ACh están formados por aperturas breves y largas. En nuestro laboratorio se describió la cinética de activación de este receptor utilizando un esquema cíclico con dos estados abiertos y dos cerrados (Rayes et al., 2005). El mismo esquema cíclico utilizado para ACh con dos estados adicionales de bloqueo (Esquema 1.3) describió la activación del receptor por pirantel. Las constantes de activación obtenidas fueron similares a las de ACh. El análisis indica que una vez que se encuentran todos los sitios de unión de agonistas ocupados por pirantel, el receptor se abre

eficientemente, se cierra y se reabre varias veces más experimentando transiciones principalmente a través de los estados cerrado breve (C1), abierto largo (A2), abierto breve (A1) y de bloqueo (A1B y A2B).

Bases estructurales de la alta selectividad de pirantel y morantel por $\alpha 7$

El diferente modo de activación de pirantel y morantel sobre los distintos subtipos de receptores nACh podría resultar de diferencias en la afinidad de estas moléculas por el sitio de unión de agonistas, o la eficacia o habilidad de abrir el canal una vez unido. No es fácil distinguir entre afinidad y eficacia (Colquhoun, 1998). En la afinidad están implicadas una serie de interacciones entre el agonista y el sitio de unión que incluyen dipolo-cación, π -cación, puentes de hidrógeno y fuerzas van der Waals (Celie et al., 2004; Dougherty, 2007; Xiu et al., 2009), y en la eficacia cambios conformacionales que incluyen diversas interacciones entre diferentes regiones del receptor, incluida la interfase entre el dominio extracelular y el transmembrana, capaces de producir la apertura del poro y el pasaje de iones (Bouzat et al., 2008; Bartos et al., 2009a). Por lo tanto, los residuos involucrados en la selectividad de pirantel y morantel por $\alpha 7$ podrían estar localizados en cualquier sitio del receptor.

En este trabajo focalizamos nuestra atención sobre los residuos ubicados en el lado complementario del sitio de unión de agonistas, los cuales están menos conservados que los del lado principal entre el receptor nACh $\alpha 7$ y el muscular adulto de mamífero (Fig. 1.13). Las mutaciones de los residuos no conservados del *loop* E ($\alpha 7$ -N111Y y $\alpha 7$ -Q117T) afectan de una manera cuantitativamente similar tanto a ACh como al resto de los fármacos antihelmínticos estudiados, indicando que estas posiciones no son selectivas para pirantel y morantel. Se ha reportado previamente que las posiciones equivalentes del receptor nACh de *Torpedo*, γ Tyr111 y γ Tyr117, interaccionan con el relajante muscular no despolarizante *d*-tubocurarina (Chiara et al., 1999; Willcockson et al., 2002). La mutación $\alpha 7$ -G167A del *loop* F, no afecta la activación de ACh o de los fármacos antihelmínticos, sin embargo, dicha posición está involucrada en la sensibilidad del receptor nACh $\alpha 7$ por el insecticida neonicotinoide imidacloprid (Matsuda et al., 2000).

La mutación del residuo de la posición 57 del *loop* D en el receptor nACh $\alpha 7$ por el equivalente de la subunidad ϵ muscular disminuye la eficacia de activación de pirantel y morantel sin afectar la activación de ACh o los antihelmínticos oxantel y levamisol. A nivel de macrocorrientes observamos una reducción en el pico máximo con pirantel o morantel, un

incremento de 2 veces del EC_{50} (disminución de la potencia) y una disminución en el coeficiente de Hill (nH) para ambos antihelmínticos. La reducción del nH indica un debilitamiento del gatillado (Colquhoun, 1998), esto quiere decir que las subunidades del receptor pierden la coordinación necesaria entre ellas para lograr abrir el poro del canal. A nivel de canal único, la reducida activación de pirantel y morantel la observamos con el incremento de la mínima concentración capaz de detectar canales y una reducción en los tiempos de *bursts*. La reducción en el tiempo de *burst* puede deberse a cambios en la constante de disociación del agonista, gatillado del canal y/o desensibilización. Como no se observan componentes de cierre sensibles a la concentración de agonista, no se puede evaluar los pasos de unión del agonista en el análisis cinético del receptor $\alpha 7$ -5HT_{3A} (Rayes et al., 2005). Sin embargo, mediante estudios de modelado de estos fármacos en el sitio de unión podemos inferir que la posición 57 estaría involucrada en la unión de pirantel y morantel (ver más adelante). Por lo tanto, cuando mutamos Q57G en $\alpha 7$, la afinidad de pirantel y morantel por el sitio de unión estaría afectada, modificando las constantes de disociación. Las corrientes macroscópicas tampoco muestran cambios significativos en las constantes de caída, de esta manera descartamos que la reducción en el tiempo de *burst* se deba a cambios en la desensibilización. El análisis cinético muestra cambios profundos en el gatillado del canal ya que en presencia de la mutación, el esquema cíclico puede ser simplificado por uno lineal con un único estado abierto largo (A2), uno cerrado breve (C1) y uno bloqueado (A2B). En la quimera sin mutar, las aperturas breves (A1) dentro de los *bursts* corresponden a un 30 % del total de las aperturas. En la quimera mutada, estas aperturas desaparecen, generando una disminución del tiempo de *burst* junto una reducción de aproximada del 40 % del pico de la corriente.

De esta manera, la posición 57, localizada en el lado complementario del sitio de unión de agonistas, está involucrada en la acción diferencial de pirantel y morantel en los receptores nACh muscular y $\alpha 7$. La mutación en dicha posición afecta la eficacia del gatillado (determinado en el estudio cinético) y la afinidad por el sitio de unión (ver estudios de *docking* más adelante).

La posición 57 está diferencialmente conservada entre las distintas subunidades nicotínicas de mamíferos. Glicina está presente en las subunidades ϵ , ácido glutámico o aspártico en las subunidades δ y glutamina en las subunidades $\alpha 7$ de mamíferos. Si el residuo glutamina en $\alpha 7$ es reemplazado por glicina, la eficacia de activación de pirantel y morantel disminuye. Si realizamos la mutación reversa en la subunidad ϵ ($\epsilon G57Q$), la eficacia de

ambos antihelmínticos para activar al receptor nACh muscular, aumenta considerablemente. Aunque estos resultados demuestran que el residuo de la posición 57 es un determinante clave en la selectividad diferencial de estos dos antihelmínticos, existirían otros residuos adicionales involucrados ya que estas mutaciones no revierten completamente los efectos. Cuando el residuo equivalente de la subunidad δ es mutado (δ D57Q) no se observan cambios en la activación por pirantel o morantel. Este resultado revela que las drogas se unen diferencialmente en ambas interfases del receptor nACh muscular y que la activación estaría mediada por la interfase α - ϵ . Otra explicación posible sería que estos dos antihelmínticos no se unan a la interfase α - ϵ , salvo en presencia de la mutación ϵ G57Q. De esta manera, las aperturas breves corresponderían al receptor monoligado, y las largas, al biligado. La mutación permitiría la unión de las drogas a una segunda interfase.

Aunque las interacciones moleculares que resultan en un agonismo parcial no son comprendidas en su totalidad, en este trabajo de Tesis demostramos que la glicina 57 del receptor nACh muscular, convierte a pirantel y morantel en agonistas parciales cuando se encuentra en el receptor α 7. Esta posición también está involucrada en la sensibilidad del receptor α 7 por insecticidas neonicotinoides (Shimomura et al., 2002). De esta manera, este residuo parece funcionar como determinante de selectividad de un amplio espectro de drogas.

Por otro lado, estudiamos la contribución del residuo de la posición 153 ubicado en el lado principal del sitio de unión de agonistas (Brejc et al., 2001). En las subunidades α de mamíferos existe en esta posición glicina, por el contrario, en las subunidades α musculares de nematodos, tales como UNC-38, α 1 *A. suum*, TAR1 *T. colubriformis*, existe ácido glutámico. En los gusanos este residuo estaría involucrado en la alta eficacia de activación de los receptores nACh por levamisol. La mutación de la posición 153 en el receptor nACh muscular de mamífero (α 1-G153E), aumenta la eficacia de activación de levamisol (Rayes et al., 2004).

Al igual que en el nAChR muscular, la mutación α 7-G153E aumenta la potencia de activación tanto de ACh como de fármacos antihelmínticos, siendo mayor el incremento para estas últimas drogas. Estos resultados coinciden con los reportados previamente por Grutter y colaboradores (2003), donde determinaron que la mutación G153K aumenta la potencia y afinidad de diferentes ligandos (ACh, nicotina, epibatidina) de manera selectiva en el receptor α 7 (Grutter et al., 2003).

Los experimentos con la doble mutación Q57G-G153E en α 7, muestran la contribución de ambos residuos en la activación de los antihelmínticos. Los estudios a nivel

de canal único y macroscópico determinaron que ACh, oxantel y levamisol interaccionan sólo con el residuo de la posición 153. Por el contrario, pirantel y morantel interaccionan con ambas posiciones. Extrapolando estos resultados a los receptores nACh de nematodos, la mutación puntual en la posición 57, afectaría la sensibilidad sólo de pirantel y morantel, pero no la de oxantel o levamisol. La mutación en la posición 153 del lado principal afectaría a todos los fármacos antihelmínticos. Existen estudios que reportan el cambio de tratamiento de pirantel a levamisol de animales infestados por *Oesophagostomum spp*, debido a que los parásitos adquirieron resistencia contra pirantel (Bjorn et al., 1990). El desarrollo de resistencia podría ser explicado, en este caso, por la mutación espontánea de la posición 57 que afecta la acción de pirantel pero no la de levamisol.

Estudios *in silico*

Para comprender a nivel molecular el tipo de interacción de los fármacos antihelmínticos con el sitio de unión de agonistas decidimos realizar estudios *in silico*. El modelado fue realizado en el laboratorio de Sarah Lummis del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Cambridge, UK. Esta colaboración fue realizada con el objetivo de establecer cómo la posición 57 del sitio de unión de agonistas está involucrada en la eficacia de activación de los nAChRs por drogas antihelmínticas. El estudio se realizó utilizando dos de los cuatro antihelmínticos (Fig. 1.22), uno completo, morantel, y uno parcial, oxantel sobre el dominio extracelular del receptor $\alpha 7$.

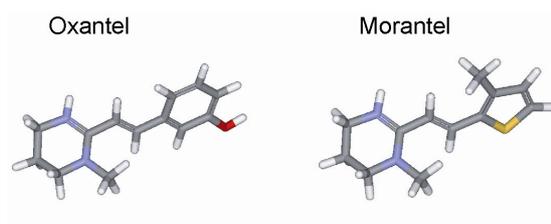


Fig. 1.22: Estructuras moleculares de los fármacos antihelmínticos utilizados en el estudio de *docking*. Los átomos están coloreados en gris (C), blanco (H), azul (N), amarillo (S), y rojo (O).

En la figura 1.23, mostramos la vista superior (A) y lateral (B) del dominio extracelular de $\alpha 7$ con los dos fármacos antihelmínticos superpuestos.

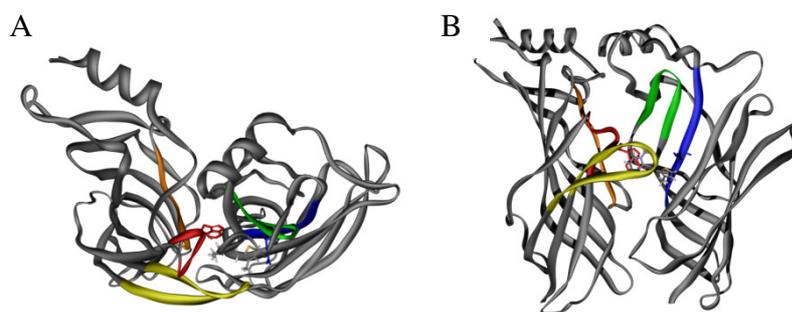


Fig 1.23: *Docking* del dominio extracelular de $\alpha 7$ con los antihelmínticos morantel y oxantel superpuestos. A: Vista superior. B: Vista lateral.

Los estudios mostraron tres diferentes orientaciones para cada molécula. En la orientación 1 (Fig 1.24), el grupo metil-tetrahidropirimidina, común en ambas drogas, está localizado a 5 Å del residuo W149 del *loop* B del lado principal del sitio de unión de agonistas. El otro grupo cíclico es un metil-tiofeno en morantel y un hidroxifenol en oxantel y están orientados hacia el *loop* D a menos de 3 Å del residuo Q57. Las moléculas adoptan una posición horizontal.

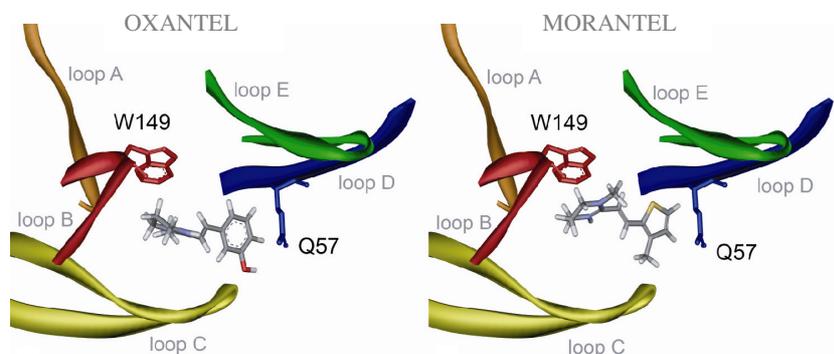


Fig. 1.24: Orientación 1 de oxantel (izquierda) y morantel (derecha) en el sitio de unión de $\alpha 7$. Los *loops* están coloreados en naranja (*loop* A), rojo (*loop* B), amarillo (*loop* C), azul (*loop* D) y verde (*loop* E). Los residuos W148 y Q57 están en rojo y azul, respectivamente.

En la orientación 2 (Fig 1.25), el anillo metil-tetrahidropirimidina de ambas moléculas nuevamente está localizado cerca de W149, pero los extremos opuestos están próximos al *loop* E a más de 6 Å del residuo Q57 (*loop* D). Ambos fármacos adquieren una orientación vertical en el sitio de unión de agonistas.

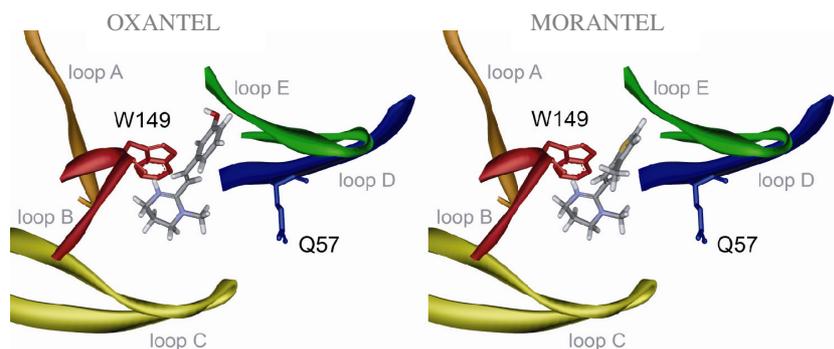


Fig. 1.25: Orientación 2 de los fármacos antihelmínticos oxantel y morantel en el sitio de unión de $\alpha 7$. Los *loops* y los residuos del sitio de unión están coloreados como se indica en la Fig. 1.24.

Finalmente, en la orientación 3 (Fig 1.26), las moléculas están reorientadas, de manera que los grupos metil-tiofeno y el hidroxí-fenol están ubicados cerca de W149 y el anillo metil-tetrahidropirimidina está dirigido hacia el lado complementario del sitio de unión de agonistas a más de 6 Å de la posición 57.

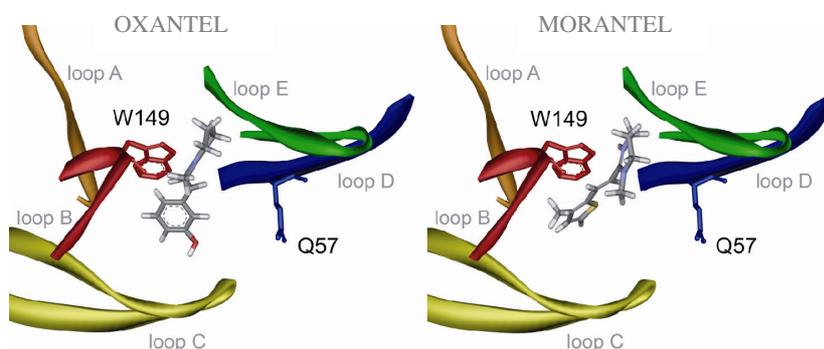


Fig. 1.26: Orientación 3 de los fármacos oxantel (izquierda) y morantel (derecha) en el sitio de unión de $\alpha 7$. Los *loops* y los residuos del sitio de unión están coloreados como se indica en la Fig. 1.24.

A partir de estas orientaciones podemos seleccionar, de acuerdo a los datos experimentales y bibliográficos, a aquellas que mejor explican los resultados antes obtenidos.

El sitio de unión de agonistas de los nAChRs (para más detalle ver Introducción) contiene aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr, Trp) capaces de formar con agonistas que presentan grupos con cargas positivas, interacciones π -catión (Lester et al., 2004). Estas interacciones son fuerzas de unión no covalentes entre el anillo aromático del aminoácido, que provee una región con potencial electrostático negativo, y moléculas con carga positiva

(Dougherty, 2007). La ACh posee un amonio cuaternario que interacciona mediante este tipo de fuerzas con el residuo aromático (Trp) de la posición 149 del lado principal del sitio de unión (Zhong et al., 1998). De la misma manera, la nicotina interacciona con $\alpha 7$ mediante fuerzas π -catión. Sin embargo, en el receptor muscular donde este tipo de fuerzas no existen, cambia su comportamiento a agonista parcial (Xiu et al., 2009). El anillo metil-tetrahidropirimidina de los antihelmínticos pirantel, morantel y oxantel, posee un amonio cuaternario con carga positiva, que le permitiría formar la interacción π -catión con W149 del *loop* B del lado principal del sitio de unión. Estos antihelmínticos son agonistas eficaces del receptor $\alpha 7$ (a excepción de oxantel), por lo que es probable que ocurra este tipo de interacción. De esta manera, los datos apoyan las orientaciones 1 (Fig. 1.24) y 2 (Fig. 1.25) para los antihelmínticos oxantel y morantel.

Las mediciones electrofisiológicas a nivel de canal único y macroscópicas muestran que morantel es un agonista más eficaz que oxantel en el receptor $\alpha 7$, y que la mutación de la posición Q57 del *loop* D afecta únicamente la eficacia de morantel. Estos hallazgos podrían deberse a la distinta localización de los grupos metil-tiofeno en morantel y un hidroxifenol en oxantel en el lado complementario del sitio de unión de agonistas. Morantel adoptaría la orientación 1 (Fig. 1.24) donde el grupo metil-tiofeno interaccionaría con Q57 ($< 3 \text{ \AA}$) mediante interacciones σ (Brandl et al., 2001) y puente H, y oxantel, la posición 2 (Fig. 1.25) donde el hidroxifenol estaría localizado a una distancia considerable de Q57 ($> 6 \text{ \AA}$).

Estudios *in silico* realizados posteriormente en nuestro laboratorio demostraron que el reemplazo de Q57 por glicina en el receptor $\alpha 7$, cambia profundamente la orientación de morantel en el sitio de unión de agonistas, ya que la molécula difícilmente adquiere la orientación 1 (Fig. 1.24).

Los estudios de *docking* son extremadamente útiles para brindar información sobre la orientación de los ligandos en el sitio de unión de agonistas de diversos receptores (Price et al., 2008; Xiu et al., 2009; Ulens et al., 2009). Una fuerte interacción entre el grupo metil-tiofeno de morantel con el residuo Q57, junto con la interacción π -catión del grupo metil-tetrahidropirimidina con W149, explicaría la alta eficacia de activación del receptor nACh $\alpha 7$ por este fármaco. Por otro lado, oxantel adoptaría una posición diferente a la de morantel ya que la mutación en la posición 57 no altera su comportamiento en $\alpha 7$.

Sensibilidad y resistencia a los fármacos antihelmínticos

Nuestros resultados indican que el nAChR es poco activable por pirantel y morantel cuando contiene glicina en las posiciones 153 (lado principal) y 57 (lado complementario) del sitio de unión de agonistas. Por el contrario, la máxima sensibilidad de los nAChRs estaría dada cuando existe ácido glutámico en la posición 153 y glutamina en la posición 57. La combinación exacta de subunidades que componen a los receptores nACh sensibles a levamisol en nematodos *C. elegans* no se conoce (Culetto et al., 2004). Sin embargo, cuando comparamos dentro de este grupo de subunidades secuencias que podrían formar el lado principal y/o complementario, podemos especular que los residuos, que dan la máxima sensibilidad a los antihelmínticos pirantel y morantel, E153 y Q57 serían aportados por UNC-38 y UNC-63, respectivamente. Estos residuos también estarían involucrados en la generación de resistencia de los gusanos parásitos a los antihelmínticos (Bartos et al., 2006a; Martin and Robertson, 2007) ya que si se producen mutaciones espontáneas en estas posiciones a glicina, el parásito se vuelve resistente a la acción de estos fármacos.

La resistencia a drogas antihelmínticas es un grave problema que afecta a gran parte de la población mundial creando serias pérdidas económicas. Las bases de la resistencia dependen de una serie de factores genéticos, ambientales y humanos. La resistencia a agonistas colinérgicos por parte de los parásitos se produce por cambios en los niveles de expresión de las subunidades que componen los nAChRs (Williamson et al., 2009) y por alteraciones en la unión de estas drogas con los receptores nACh musculares de nematodos (Martin and Robertson, 2007).

La creación de resistencia por parte de los parásitos a drogas antihelmínticas tiene que ver con el uso continuo e imprudente de los mismos fármacos que favorecen la prevalencia de cepas resistentes. Actualmente surgió un nuevo grupo de antihelmínticos derivados de los amino-acetonitrilos (AADs) (Kaminsky et al., 2008a). En los estudios realizados hasta el momento encontraron que uno de ellos, monepantel (AAD 1566) tiene alta actividad contra nematodos gastrointestinales, incluyendo a los resistentes, es altamente eficaz y tolerable, de baja toxicidad para los mamíferos (Kaminsky et al., 2008b) y su acción se cree que es sobre los receptores nACh (Rufener et al., 2009). Este nuevo fármaco antihelmíntico forma parte de una nueva estrategia terapéutica contra las parasitosis.

El conocimiento de las bases moleculares de la formación de la resistencia de gusanos parásitos a antihelmínticos ayudará a desarrollar nuevos fármacos para combatir las parasitosis.

Conclusiones finales

En este trabajo de Tesis se muestra el estudio de la acción de cuatro fármacos antihelmínticos (pirantel, morantel, oxantel y levamisol) sobre dos subtipos de receptores nACh. Se determinó que: i) todos son agonistas parciales del receptor nACh muscular adulto de mamífero; ii) los agentes pirantel y morantel son agonistas completos y más potentes que la ACh en el receptor $\alpha 7$, mientras que levamisol y oxantel continúan siendo agonistas parciales; y iii) el residuo de la posición 57 del lado complementario del sitio de unión de agonistas es un determinante clave en la selectividad diferencial de pirantel y morantel por los nAChRs.

Este estudio aporta información sobre las bases estructurales de la acción de los antihelmínticos sobre subtipos de receptores nACh, útiles para el conocimiento de la generación de resistencia y el desarrollo de nuevos fármacos más selectivos y con menores efectos adversos.

CONCLUSIONES FINALES DEL CAPÍTULO I

- ✘ Los fármacos antihelmínticos pirantel, morantel, oxantel y levamisol, son agonistas parciales del receptor nACh muscular adulto de mamífero ($\alpha 2\beta\delta\epsilon$).
- ✘ Pirantel y morantel son agonistas altamente eficaces y más potentes que la ACh para el receptor nACh $\alpha 7$. Por el contrario, levamisol y oxantel continúan actuando como agonistas parciales.
- ✘ Todos estas drogas actúan como bloqueadores de canal abierto de los nAChRs.
- ✘ La mutación $\alpha 7$ -Q57G, localizada en el lado complementario del sitio de unión de agonistas, disminuye la potencia y eficacia en la activación por pirantel y morantel. Esta posición no afecta la activación por ACh ni por los agentes antihelmínticos levamisol y oxantel.
- ✘ La potencia de activación de los fármacos antihelmínticos y ACh aumenta cuando el receptor es mutado en la posición 153 del lado principal del sitio de unión de agonistas ($\alpha 7$ -G153E).
- ✘ Los receptores nACh más sensibles a drogas antihelmínticas serían aquellos que contienen en su sitio de unión ácido glutámico en la posición 153 (lado principal) y glutamina en la posición 57 (lado complementario). Este tipo de combinación la encontramos en subunidades nicotínicas musculares de gusanos.
- ✘ Por el contrario, cuando estas dos posiciones determinantes de sensibilidad contienen glicina, los fármacos antihelmínticos actúan como agonistas parciales sobre el receptor nACh, como ocurre en el nAChR muscular de mamífero.

CAPÍTULO II

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

La resolución en alta escala de la estructura de la proteína unidora de ACh (AChBP) del caracol *Lymnaea stagnalis* (Brejc et al., 2001), junto con la del receptor nACh de la raya marina *Torpedo* (Unwin, 2005) y la de la subunidad $\alpha 1$ muscular de ratón (Dellisanti et al., 2007), nos permitió comprender mejor a nivel molecular la estructura de los receptores Cys-loop. Actualmente la cristalización de canales iónicos activados por ligandos de las bacterias *Erwinia chrysanthemi* (ELIC) y *Gloeobacter violaceus* (GLIC) probablemente en los estados de reposo y abierto (Hilf and Dutzler, 2008; Bocquet et al., 2009; Hilf and Dutzler, 2009b), nos brindó información sobre los posibles movimientos que se producirían luego de la unión del agonista.

Los receptores Cys-loop pueden ensamblarse a partir de cinco copias de una misma subunidad, formando homopentámeros, o de subunidades diferentes, formando heteropentámeros. Evolutivamente, los primeros receptores Cys-loop fueron homopentaméricos, por lo que son hoy en día modelos para estudiar la relación estructura-función. Cada subunidad posee un dominio extracelular, donde se encuentra el sitio de unión de agonistas, y uno transmembrana, donde se ubican los filtros de selectividad de iones y la compuerta del canal (Fig. 2.1).

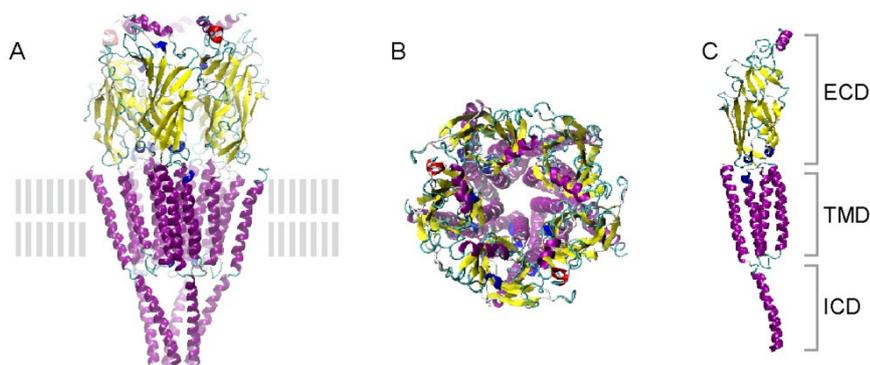


Fig. 2.1: Estructura de los receptores Cys-loop. A: Vista completa del receptor pentamérico. B: Vista superior. C: Subunidad mostrando el dominio extracelular (ECD), el transmembrana (TMD) y el intracelular (ICD).

El sitio de unión de agonistas se encuentra proyectado sobre el espacio sináptico extracelular, mientras que el poro del canal se localiza dentro de la membrana (Unwin, 2005).

Estas dos regiones están separadas por una distancia de 50 Å. La activación comienza con una serie de interacciones entre el agonista y el sitio de unión que se propagan a la interfase ubicada entre el dominio extracelular y el transmembrana. El *loop* C, responsable de “atrapar” al agonista en el sitio de unión, está conectado al segmento M1 por medio de $\beta 10$. Una serie de interacciones entre los extremos inferiores de las hojas plegadas β del dominio extracelular con los extremos superiores de las hélices α del dominio transmembrana llevarían al movimiento de las hélices que forman el poro permitiendo el pasaje de iones.

La interfase entre los dominios extracelular y transmembrana tiene considerable atención porque es una zona estructural de transición en la cual las hojas plegadas β del dominio unidor de ACh se unen con las hélices α del poro iónico (Fig. 2.2). Dentro de esta zona, numerosos *loops* interaccionan para acoplar los cambios estructurales del sitio de unión de agonistas hacia el poro del canal. La interfase está formada por los *loops* $\beta 1\beta 2$, Cys-, $\beta 8\beta 9$ y $\beta 10$ provenientes del dominio extracelular y las porciones pre-M1, M2M3 y post-M4 del dominio transmembrana (Fig. 2.2)

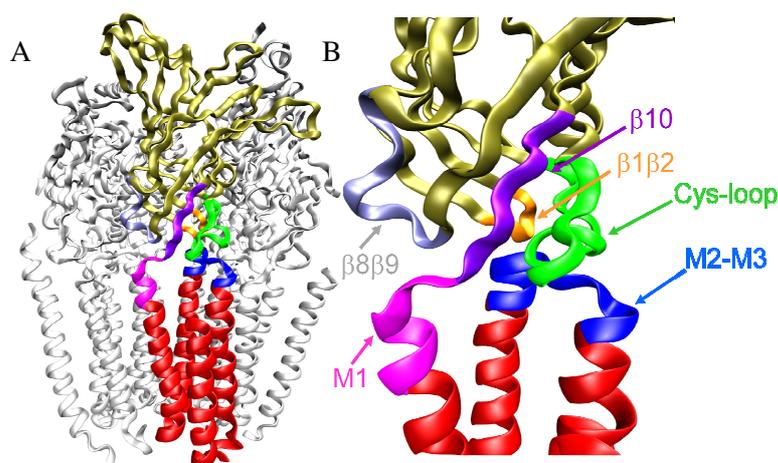


Fig. 2.2: Interfase entre los dominios extracelular y transmembrana del modelo del receptor nACh de *Torpedo* a 4 Å de resolución (PDB 2BG9). A: Subunidad pentamérica resaltada, con el dominio extracelular en amarillo y el transmembrana en rojo. B: Región ampliada de la interfase. Los distintos componentes fueron coloreados en verde (Cys-loop), azul (M2M3), naranja ($\beta 1\beta 2$), gris ($\beta 8\beta 9$), lila ($\beta 10$), y rosa (pre-M1). Las imágenes se generaron con el software VMD (Humphrey et al., 1996).

Hace unos años se demostró que esta zona estructural es de suma importancia para el funcionamiento del receptor con una quimera formada en el dominio extracelular por la proteína unidora de ACh (AChBP) y en el transmembrana por el receptor de serotonina (5-HT_{3A}). La quimera resultante unía ACh pero no era funcional. Únicamente cuando se

reemplazaron las secuencias de los *loops* Cys-, $\beta 1\beta 2$ y $\beta 8\beta 9$ de la AChBP por secuencias de 5-HT_{3A}, se restauró el acoplamiento funcional de la interfase y la funcionalidad del receptor (Bouzat et al., 2004). Estos resultados resaltan la importancia de las interacciones alostéricas específicas entre ambos dominios.

El objetivo de este capítulo es mostrar la importancia de la interfase comprendida entre el dominio unidor de ACh y el formador del poro iónico en la cinética de activación y desensibilización de receptores homopentaméricos y la contribución de los diversos *loops* que la componen. Con este fin, evaluamos la funcionalidad de dos receptores homopentaméricos pertenecientes a la familia Cys-loop, el nAChR $\alpha 7$ y el de 5-HT_{3A}, mediante la técnica electrofisiológica de *Patch-clamp*. Luego generamos diversas quimeras conteniendo interfases con secuencias mixtas y homogéneas y evaluamos los tiempos de apertura y desensibilización de los receptores formados. Además evaluamos la contribución de los diferentes componentes de la interfase, prestando especial atención a los *loops* Cys-, $\beta 8\beta 9$, el extremo pre-M1 y el *linker* M2M3.

Este trabajo fue realizado en colaboración con el laboratorio de Steven Sine de la Clínica Mayo de USA. La caracterización del receptor 5-HT_{3A} fue realizada por Corradi y colaboradores (2009) en nuestro laboratorio.

RESULTADOS

1- PROPIEDADES FUNCIONALES DE RECEPTORES HOMOPENTAMÉRICOS

Las propiedades funcionales de los receptores homopentaméricos nACh $\alpha 7$ y 5-HT_{3A} las evaluamos registrando corrientes unitarias y macroscópicas en células BOSC-23 transfectadas con el cDNA de cada uno de los receptores.

1.1 Receptor nACh $\alpha 7$

i) Corrientes unitarias y macroscópicas de $\alpha 7$ activadas por ACh

Comenzamos la caracterización del receptor nACh $\alpha 7$ obteniendo corrientes unitarias en la configuración *cell-attached* a un potencial de membrana de -70 mV. Para obtener un receptor

funcional es necesario co-transfectar el ADNc de $\alpha 7$ con el de la chaperona Ric-3 (Williams et al., 2005) en una proporción de 4 μg de $\alpha 7$ y 20 μg de Ric-3 por cápsula.

Los canales de $\alpha 7$ se detectan en un rango de concentración de ACh de 10-500 μM . En todas las concentraciones testeadas los canales son breves y aislados separados por períodos de cierres largos (Fig. 2.3). Con menos frecuencia aparecen aperturas continuas agrupadas en *burst*. La amplitud de los canales es de 9.6 ± 1.7 pA (-70 mV).

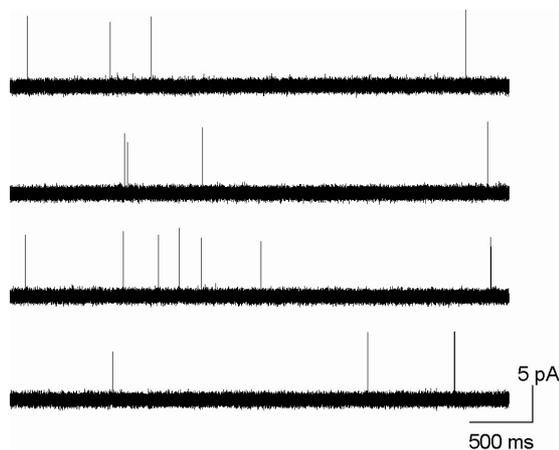


Fig. 2.3: Canales únicos del receptor nACh $\alpha 7$ obtenidos en la configuración *cell-attached*. ACh 100 μM . Potencial de membrana -70 mV.

El histograma de aperturas se ajusta con dos componentes de 320 ± 150 μs (0.30 ± 0.15) y 60 ± 30 μs (0.70 ± 0.10) (Fig. 2.4). Las aperturas breves son generalmente aisladas, mientras que las largas pueden estar aisladas o formando parte de un grupo de aperturas sucesivas (*bursts*). No observamos activación en forma de *clusters* en ninguna de las concentraciones testeadas.

El histograma de cierres se ajusta con tres o cuatro componentes, el más breve corresponde a los cierres dentro de un *burst*, mientras que los más largos, a cierres entre aperturas independientes, entre *bursts* o ambos (Fig. 2.4). El componente de cierre más breve se observa sistemáticamente en todos los registros y su duración es de 117 ± 35 μs (área relativa: 0.15 ± 0.03 ; $n= 4$). Los otros componentes son variables y dependen del nivel de expresión.

Para caracterizar los *bursts* y cuantificar su duración, definimos un tiempo crítico de cierre (t_{crit}) que se obtiene del punto de intersección entre el componente más breve y el

sucesivo. Para la mayoría de los registros el t_{crit} varía entre 0.4 y 1 ms. Las aperturas separadas por tiempos menores a este tiempo crítico constituyen un *burst* (Fig 2.4). El componente más largo del histograma resultante corresponde al tiempo de *burst* y es de $330 \pm 50 \mu s$. Si comparamos el histograma de tiempo de estado abierto y el de *burst* podemos ver que la duración de las aperturas más breves en los dos histogramas es igual, mientras que la duración del componente más largo aumenta ligeramente en el histograma de *burst*. Aquellas aperturas aisladas cuyos tiempos coinciden con el tiempo de *burst* definido del histograma también se los considera un *burst* (Fig. 2.4).

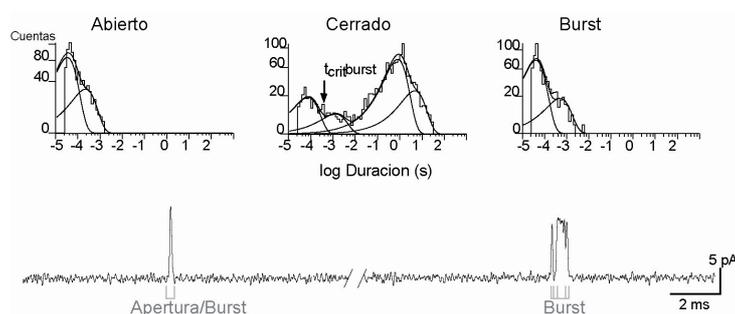


Fig. 2.4: Histogramas y trazos de canal único representativos de $\alpha 7$. Arriba: Histogramas de tiempo de estado abierto, cerrado y de *burst*. ACh $100 \mu M$. Potencial $-70 mV$. En el histograma de cierre se marca el tiempo crítico con t_{crit} . Abajo: Trazos de corrientes con ejemplos de aperturas aisladas largas/*burst* y aperturas sucesivas/*burst*.

Registramos corrientes macroscópicas de $\alpha 7$ a partir de la configuración *outside-out*, donde pequeños parches de membrana celular conteniendo al receptor son rápidamente perfundidos con un pulso de 500 ms de ACh $1 mM$ (Fig. 2.5).

Las corrientes macroscópicas de $\alpha 7$ decaen rápidamente. La constante de decaimiento (τ_d) es $0.40 \pm 0.20 ms$. Si, por un lado, la probabilidad de apertura del canal es alta y la velocidad de recuperación de la desensibilización en presencia de agonista es lenta, y por otro, la activación se hace con alta concentración de agonista, el valor de $1/\tau_d$ se aproxima a la velocidad de desensibilización. Por lo tanto, podemos estimar la velocidad de desensibilización a partir de la velocidad de decaimiento.

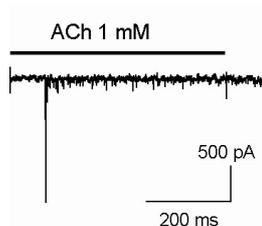


Fig. 2.5: Corriente macroscópica de $\alpha 7$ obtenida en la configuración *outside-out* con una concentración de ACh 1 mM. Potencial de membrana: -50 mV.

Como se mostró anteriormente, en presencia de altas concentraciones de ACh, el receptor $\alpha 7$ se activa en forma de aperturas breves separadas por períodos largos de cierre (Fig. 2.3). Esta forma de activación podría estar dada por: i) una constante de velocidad de apertura lenta; ii) una velocidad de asociación lenta o de disociación rápida, o ambas al mismo tiempo; o iii) una velocidad de desensibilización rápida. Como las corrientes macroscópicas obtenidas en la configuración *outside-out* alcanzan el pico máximo en menos de 1 ms (Fig. 2.6), eliminamos la posibilidad de una velocidad de apertura lenta.

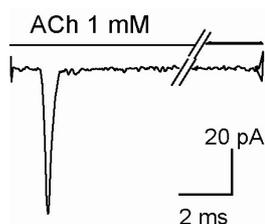


Fig. 2.6: Corriente macroscópica de $\alpha 7$ obtenida en la configuración *outside-out* con una concentración de ACh 1 mM. El receptor alcanza el pico máximo de corriente en 0.15 ms.

Para testear las constantes de asociación y disociación de ACh, obtuvimos corrientes unitarias con concentraciones de ACh bajas y altas (10 y 100 μM). Si estas constantes influyen en la activación del canal, las corrientes de canal único estarían afectadas. Sin embargo, como la distribución de los tiempos cerrados no cambia de 10 a 100 μM de ACh (Fig. 2.7), podemos inferir que las velocidades de asociación y disociación de la ACh no influyen en la cinética de los canales únicos.

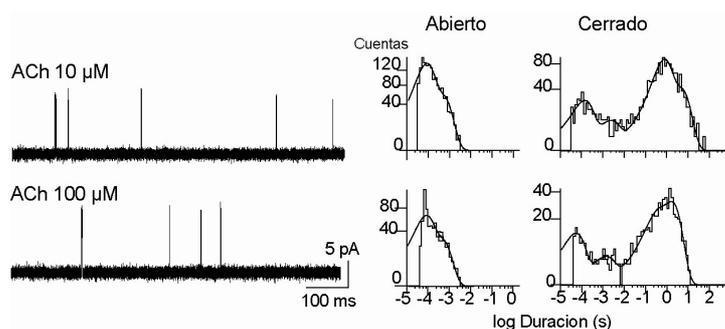


Fig. 2.7: Canales únicos del receptor nACh $\alpha 7$. Izquierda: Trazos de corrientes a 10 y 100 μM de ACh obtenidos a un potencial de membrana de -70 mV. Derecha: Histogramas de tiempo de estado abierto y cerrado correspondientes a cada concentración.

Por último, como la constante de decaimiento debido a desensibilización de las corrientes macroscópicas ($\tau_d \sim 0.40$) es similar al tiempo de estado abierto ($\tau_o \sim 0.30$) de los canales unitarios y al de *burst* ($\tau_b \sim 0.33$), podemos concluir que la rápida desensibilización determina la velocidad de cierre del receptor nACh $\alpha 7$.

ii) Análisis cinético del receptor nACh $\alpha 7$

Para caracterizar en detalle la activación del receptor nACh $\alpha 7$, se realizó un análisis de la cinética de activación utilizando los tiempos de apertura y cierre dentro de los *bursts*. Para ello se utilizó un esquema conteniendo un estado cerrado (C), uno abierto (A) y uno desensibilizado (D) (Esquema 2.1) (Auerbach and Akk, 1998; Mike et al., 2000). Los estados C y D no son conductores de iones pero pueden distinguirse por sus diferentes duraciones.



Cuando ACh se une a todos los sitios de unión, el receptor se abre con una velocidad β . Luego puede cerrarse con una velocidad α o desensibilizarse con una velocidad $d+$. Asumimos que todas las transiciones son de C a A porque utilizamos concentraciones saturantes de ACh. Además, como el estado D es más prolongado que el C, las transiciones de D a A dentro de un *burst* no ocurren. El *burst* termina por desensibilización.

En presencia de concentraciones saturantes de ACh, el Esquema 2.1 predice que el número de cierres por *burst* es $\alpha/d+$, la duración de las aperturas dentro del *burst* es $(\alpha + d+)^{-1}$, y que la duración del *burst* es aproximadamente $(1 + \alpha/d+)/(\alpha + d+)$. De esta manera, a partir de los valores obtenidos previamente del número de cierres por *burst* (0.30 ± 0.19) y de la duración de las aperturas dentro del *burst* (0.26 ± 0.12 ms) podemos estimar la velocidad de cierre α ($690 \pm 300 \text{ s}^{-1}$) y la de desensibilización $d+$ ($3320 \pm 1300 \text{ s}^{-1}$). El valor de la velocidad de desensibilización ($d+$) es mayor que el valor de la velocidad de cierre (α), esto

significa que una vez que el receptor se abre, es más probable que se desensibilice antes de que vuelva al estado de reposo.

De acuerdo al Esquema 2.1, se asume que dentro de los *bursts* existe una única forma de activación. Los *bursts* contienen principalmente aperturas largas. Las aperturas breves no forman parte de los *bursts* sino que ocurren de manera aislada. De esta manera, las velocidades α y $d+$, son útiles a la hora de explicar la forma de activación dentro de un *burst*.

Con los valores del Esquema 2.1 y asumiendo que la velocidad de apertura β es rápida, pueden simularse corrientes macroscópicas idénticas a las obtenidas experimentalmente (Fig. 2.8). Las corrientes fueron simuladas usando el programa de computación QuB (QUB Suite, State University of New York, Buffalo) y analizadas con el programa SigmaPlot 7.101. El valor de la constante de apertura β se varió entre 5000 a 20000 s^{-1} sin producirse modificaciones significativas de las corrientes simuladas.

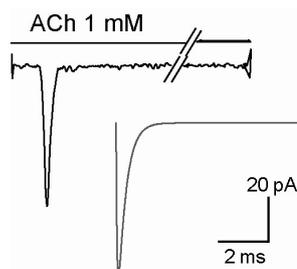


Fig. 2.8: Corriente macroscópica de $\alpha 7$ obtenida en forma experimental (arriba) y simulada (abajo).

iii) Recuperación de la desensibilización del receptor nACh $\alpha 7$

Los períodos de latencia entre sucesivas respuestas sinápticas son controlados por la desensibilización del receptor. Si el receptor nACh $\alpha 7$ se recuperara lentamente de este estado, la duración entre una respuesta y la siguiente resultaría muy larga.

Para medir el tiempo de recuperación de la desensibilización utilizamos un protocolo de doble pulso. En este experimento, se aplica un pulso de ACh 1 mM de 150 ms, y luego de distintos tiempos de aplicación de una solución libre de ACh (que varían de 0.25 a 6 segundos) se aplica un segundo pulso de agonista. Se utilizó la configuración *whole-cell* para obtener corrientes de mayor magnitud que las obtenidas en la configuración *outside-out*. En esta configuración las corrientes en general decaen más lentamente que en *outside-out*. La variabilidad en los valores de desensibilización entre ambas configuraciones se debe a diferencias en la velocidad y uniformidad de exposición de los receptores al agonista (Zhang

et al., 1996; Liu and Berg, 1999; Mike et al., 2000). A pesar de esto, en la configuración *whole-cell* las corrientes alcanzan el pico máximo en menos de 10 ms y por lo tanto pueden utilizarse para estas determinaciones.

En la figura 2.9 se muestra las corrientes recuperadas en función de los distintos tiempos de aplicación del segundo pulso (Fig. 2.9 A) y la curva de la fracción de recuperación vs el tiempo de recuperación (Fig. 2.9 B). Luego de desensibilizarse, el receptor nACh $\alpha 7$ recupera un 50 % de la respuesta luego de 1.10 ± 0.08 segundos. Pasado ese tiempo, puede generar nuevamente una respuesta de la misma magnitud.

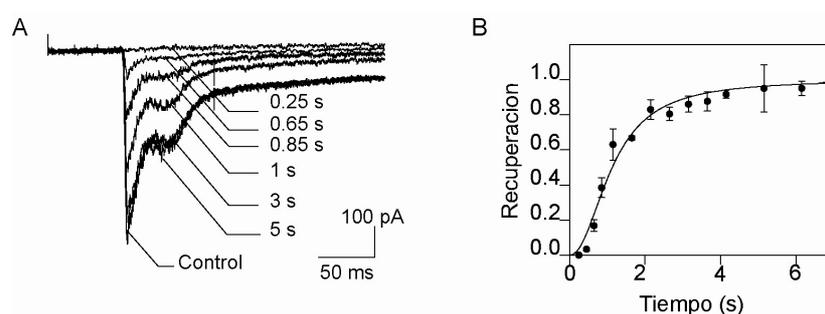


Fig. 2.9: Recuperación de la desensibilización del receptor $\alpha 7$. A: Corrientes obtenidas en la configuración *whole-cell* con un pulso de 150 ms de ACh 1 mM. El primer pulso es el control. El segundo pulso (realizados a distintos tiempos) se encuentra en el mismo trazo. Potencial de membrana: -50 mV. B: Curva graficando la fracción de la recuperación vs el tiempo de recuperación en segundos.

Este modo tan particular de respuesta del receptor nACh $\alpha 7$, con una velocidad de desensibilización rápida ($\tau_d \sim 0.4$ ms), principal determinante del tiempo de estado abierto ($\tau_o \sim 0.3$ ms), y una recuperación de la desensibilización lenta ($\tau_{\text{recuperación}} \sim 1.1$ s), hace que la latencia entre sucesivas respuestas sinápticas sea prolongada. Este mecanismo, hace que $\alpha 7$ funcione como un sensor altamente sensible a las concentraciones de ACh, ya que actúa como un filtro que impide los estímulos excesivos.

1.2 Receptor de 5-HT_{3A}

La cinética de activación del receptor homopentamérico de serotonina (5-HT_{3A}) es totalmente diferente a la del receptor nACh $\alpha 7$. En esta caracterización se utilizó la forma de alta conductancia del receptor 5-HT_{3A}. La concentración de serotonina (5-HT) elegida para activar al receptor fue de 3 μM ya que es una concentración mayor al EC_{50} (2.7 ± 0.5 μM)

pero en la cual no existe bloqueo del poro por el mismo agonista (Gumilar and Bouzat, 2008; Corradi et al., 2009).

En la figura 2.10 vemos trazos de corrientes unitarias con los histogramas de tiempo de estado abierto correspondientes a 5-HT 0.1, 3 y 10 μM . Cabe destacar que a todas las concentraciones testeadas los canales aparecen en forma de *clusters* compuestos a su vez de varios *bursts* en rápida sucesión (ver más adelante). A partir de concentraciones de 5-HT superiores a 5 μM , la duración del componente más largo disminuye sistemáticamente por un efecto de bloqueo de canal abierto por 5-HT.

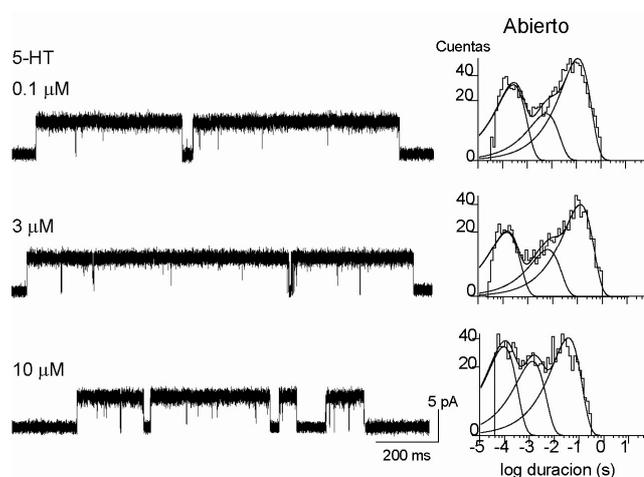


Fig. 2.10: Activación y bloqueo del receptor 5-HT_{3A} por 5-HT. Trazos de corrientes unitarias obtenidas en la configuración *cell-attached* acompañados de los correspondientes histogramas de tiempo de estado abierto a 5-HT 0.1, 3 y 10 μM .

Las aperturas del receptor de 5-HT_{3A}, obtenidos en la configuración *cell-attached* a un potencial de membrana de -70 mV con 5-HT 3 μM , son prolongadas y ocurren como eventos de apertura en rápida sucesión (Fig. 2.11). Los canales pueden agruparse en *bursts* y éstos a su vez en *clusters*.

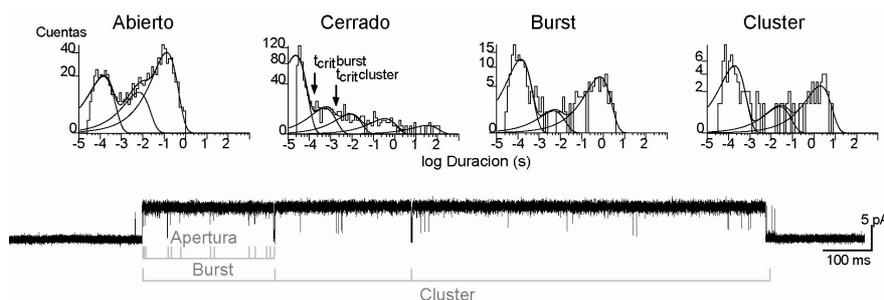


Fig. 2.11: Activación del receptor 5-HT_{3A}. Trazo representativo de corriente a 5-HT 3 μ M mostrando la duración de las aperturas, *bursts* y *clusters*. Potencial de membrana: -70 mV. Histogramas de tiempo de estado abierto y cerrado, de *burst* y de *cluster*.

El histograma de tiempo de estado abierto presenta tres componentes (Fig. 2.11). Las aperturas del componente más largo (110 ± 35 ms) las encontramos formando parte de los *bursts* de activación. Varios *bursts* forman un *cluster*. Las aperturas del componente más breve pueden estar aisladas o formando parte de un *cluster*.

El histograma de tiempo de estado cerrado se ajusta con cinco componentes (Fig. 2.11). El más breve (29 ± 10 μ s, área relativa: 0.80 ± 0.07) es el predominante y corresponde a los cierres dentro de los *bursts*. El componente sucesivo (1.0 ± 0.6 ms, área relativa: 0.11 ± 0.02), también constante entre los diversos registros, pertenece a los cierres entre *bursts* dentro de un *cluster*. Los demás componentes corresponden a cierres entre *clusters* independientes, entre aperturas aisladas, o ambas.

El histograma de *burst* se construye definiendo un tiempo crítico ($t_{\text{crit}burst}$, Fig. 2.11) en el histograma de cierres que se obtiene de la intersección entre el componente más breve y el sucesivo. En la mayoría de los registros este tiempo varía de 0.15-0.50 ms. El componente más largo del histograma formado de esta manera corresponde al tiempo de *burst* (700 ± 150 ms).

De la misma manera, el histograma de *clusters*, se construye definiendo otro tiempo crítico ($t_{\text{crit}cluster}$, Fig. 2.11) que se toma del punto de intersección entre el segundo componente más breve y el sucesivo. Las aperturas separadas por cierres más breves que este tiempo crítico, que varía de 4-10 ms, constituyen un *cluster*. Nuevamente, el componente más largo del histograma formado a partir del $t_{\text{crit}cluster}$, corresponde a los *clusters* cuya duración es de 1.29 ± 0.25 segundos.

Las corrientes macroscópicas del receptor 5-HT_{3A} se obtuvieron en la configuración *outside-out* a un potencial de membrana de -50 mV. Al igual que en canal único, se utilizó una concentración de 5-HT 3 μ M (Fig. 2.12). A esta concentración, la caída de la corriente debida a desensibilización se ajusta con un único exponencial de 1100 ± 400 ms.

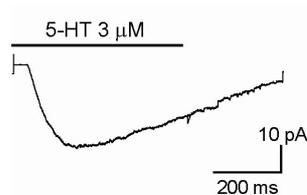


Fig. 2.12: Corriente macroscópica de 5-HT_{3A} obtenida en la configuración *outside-out* con una concentración de 5-HT 3 μM. Potencial de membrana: -50 mV.

Como el receptor de 5-HT_{3A} se bloquea con concentraciones de 5-HT mayores al EC₅₀ (2.7 μM; Gumilar and Bouzat, 2008, Corradi et al., 2009), no se usaron concentraciones saturantes del agonista; por lo tanto, la constante de decaimiento medida en el EC₅₀ representa un valor menor al real ($\tau_d = 1.1 \pm 0.4$ s). Sin embargo, las corrientes macroscópicas obtenidas con concentraciones de 5-HT mayores a 10 μM muestran dos componentes, uno rápido debido al bloqueo y uno lento, debido a la desensibilización (Corradi et al., 2009). Este último componente es dos veces más rápido que el que se obtiene en presencia de 5-HT 3 μM. Por lo tanto, a 5-HT 3 μM, el valor de τ_d real sería el doble del obtenido a esta concentración.

El Esquema 2.1 que describe la cinética de activación de los *bursts* del receptor nACh $\alpha 7$, no puede ser utilizado para describir la cinética del receptor 5-HT_{3A}, ya que en este receptor los histogramas muestran varios estados abiertos y cerrados y la activación ocurre en *bursts* y *clusters*. El complejo esquema cinético fue descrito por primera vez en nuestro laboratorio por Corradi y colaboradores (2009).

2- ROL DE LA INTERFASE ENTRE LOS DOMINIOS EXTRACELULAR Y TRANSMEMBRANA

En los últimos años surgieron numerosos trabajos que demostraron que la zona estructural que separa el dominio extracelular del transmembrana es crucial en el acoplamiento de la unión del agonista con la apertura del poro iónico (Bouzat et al., 2004; Xiu et al., 2005; Sine and Engel, 2006; Gay and Yakel, 2007; Cederholm et al., 2009; Taly et al., 2009; Chang et al., 2009). La contribución funcional de esta región depende de la interacción estructural y de la compatibilidad de los residuos proyectados de ambos dominios (Bouzat et al., 2004).

En esta sección del Capítulo II mostramos el estudio de la contribución de los *loops* $\beta 1\beta 2$, Cys-, $\beta 8\beta 9$, $\beta 10$, el segmento pre-M1 y el *linker* M2M3 en el gatillado del canal. Las secuencias de estos *loops* pertenecientes a los receptores nACh $\alpha 7$ y 5-HT_{3A} están alineadas en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1

	$\beta 1\beta 2$
	44 49
$\alpha 7$	DEKNQV
5-HT _{3A}	DEKNQV
	Cys
	128 142
$\alpha 7$	CYIDVRWFPPFDVQHC
5-HT _{3A}	CSLDIYNFPFDVQNC
	$\beta 8\beta 9$
	169 174
$\alpha 7$	IPNGEW
5-HT _{3A}	INQGEW
	$\beta 10$
	203 207
$\alpha 7$	TMRRR
5-HT _{3A}	IIRRR
	pre-M1
	208 214
$\alpha 7$	TLYYGLN
5-HT _{3A}	PLFYAVS
	M2M3
	265 274
$\alpha 7$	SDSVPLIAQY
5-HT _{3A}	AIGTPLIGVY

2.1 Interfase mixta conteniendo residuos de $\alpha 7$ y 5-HT_{3A}

Como mostramos anteriormente, el receptor nACh $\alpha 7$ forma canales muy breves con rápida desensibilización, mientras que en el receptor 5-HT_{3A}, los canales son prolongados y la desensibilización lenta. Para identificar las bases estructurales de estos dos diferentes modos de activación usamos al receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT_{3A} con secuencias de $\alpha 7$ en el dominio extracelular y de 5-HT_{3A}, en el transmembrana (Bouzat et al., 2004; Rayes et al., 2005). En la figura 2.13 esquematizamos a una subunidad del receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT_{3A}. Cabe destacar que se utilizó la forma de alta conductancia para poder detectar corrientes mediante la técnica electrofisiológica de *Patch-clamp* (ver Metodología). Los residuos de $\beta 1\beta 2$ son los mismos para $\alpha 7$ y 5-HT_{3A}. La quimera contiene secuencias de $\alpha 7$ en los *loops* Cys- y $\beta 8\beta 9$, y de 5-HT_{3A}, en los *loops* $\beta 10$, pre-M1 y M2M3. A esto llamamos interfase mixta.

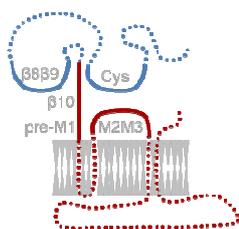


Fig. 2.13: Representación esquemática de una subunidad del receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT_{3A} conteniendo secuencias de $\alpha 7$ en azul y de 5-HT_{3A} en rojo.

Los registros de canal único de la quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A}, obtenidos en la configuración *cell-attached*, muestran canales breves y aislados y otros en forma de *bursts*, conteniendo aperturas largas, o largas y breves (Fig. 2.14). El histograma de tiempo de estado abierto está formado por tres componentes, el de mayor duración corresponde un tiempo intermedio (6.2 ± 0.2 ms) (Rayaes et al., 2005) entre los dos receptores nativos que componen la quimera (0.3 ms para $\alpha 7$ y 110 ms para 5-HT_{3A}).

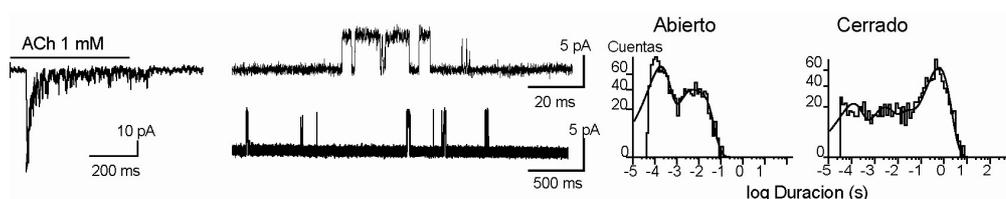


Fig. 2.14: Registros de corrientes del receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT_{3A}. Izquierda: Corriente obtenida en la configuración *outside-out* con un pulso de ACh 1 mM. Potencial de membrana: -50 mV. Derecha: Trazos de canal único activados con ACh 500 μ M acompañados de los correspondientes histogramas. Potencial de membrana: -70 mV.

Las corrientes macroscópicas del receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT_{3A} se obtuvieron en la configuración *outside-out* con un pulso de 500 ms de ACh a concentraciones saturantes (1 mM) (Fig. 2.14). El valor de la caída de la corriente debido a desensibilización es intermedio ($\tau_d = 10 \pm 2$ ms) entre $\alpha 7$ ($\tau_d = 0.4$ ms) y 5-HT_{3A} ($\tau_d = 1100$ ms).

De esta manera, el receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT_{3A}, muestra corrientes unitarias y macroscópicas intermedias entre los receptores nACh $\alpha 7$ y 5-HT_{3A}. Nuestra hipótesis es que este perfil cinético intermedio estaría dado por la interacción de los diferentes residuos de $\alpha 7$ con los de 5-HT_{3A} que forman la interfase.

2.2 Conversión de una interfase mixta en homogénea

La contribución de la interfase mixta al perfil cinético intermedio se estudió con dos quimeras adicionales formadas a partir de la quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A}: una llamada *all- $\alpha 7$* que contiene todos los *loops* de la interfase con secuencias de $\alpha 7$, y otra, *all-5HT_{3A}*, con la interfase formada por residuos de 5-HT_{3A}. Las secuencias sustituidas fueron: Cys-loop, $\beta 8\beta 9$, segmentos C-terminal de $\beta 10$ y N-terminal de M1, y *linker* M2M3 (Tabla 2.1); como la secuencia del *loop* $\beta 1\beta 2$ es idéntica para $\alpha 7$ y 5-HT_{3A} no se modificó.

i) Receptor con interfase $\alpha 7$ (*all- $\alpha 7$*)

La quimera *all- $\alpha 7$* , formada a partir del receptor $\alpha 7$ -5HT_{3A}, contiene secuencias de $\alpha 7$ en los *loops* antes mencionados de la interfase. En la figura 2.15 se esquematiza la estructura de una subunidad de la nueva quimera.

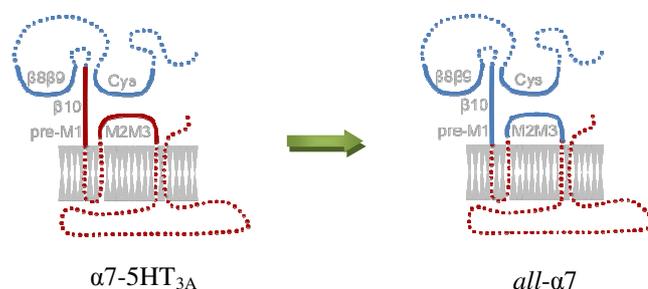


Fig. 2.15: Representación esquemática de una subunidad de las quimeras $\alpha 7$ -5HT_{3A} y *all- $\alpha 7$* . En azul, secuencias de $\alpha 7$ y en rojo, de 5-HT_{3A}.

Como las aperturas de los canales que se obtenían en la configuración *cell-attached* eran infrecuentes para obtener una distribución de los tiempos de apertura estadísticamente aceptable, registramos los canales en la configuración *outside-out*. Luego de aplicar un pulso de ACh 1 mM a -70 mV en esta configuración, se genera un pico de corriente macroscópica seguido de canales claramente identificables (Fig. 2.16). Los intervalos de cierre entre aperturas independientes aumentan a medida que el registro progresa, debido posiblemente a la desensibilización, alterando la distribución del histograma de cierre. La actividad del canal decae rápidamente y desaparece en menos de 10 segundos en presencia de ACh 1 mM (Fig. 2.16). Por lo tanto, se utilizaron los datos de numerosas aplicaciones de ACh al mismo parche para obtener un histograma. A pesar de esto, la distribución de las aperturas y cierres dentro de un *burst* no se vio afectada.

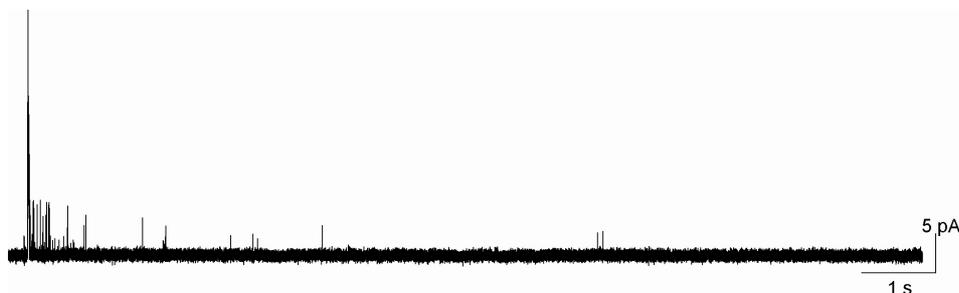


Fig. 2.16: Trazo de corriente de la quimera *all- $\alpha 7$* obtenido en la configuración *outside-out* con un pulso de ACh 1 mM. Potencial de membrana: -70 mV.

El histograma de tiempo de estado abierto de la quimera *all- $\alpha 7$* se ajusta con dos componentes (Fig. 2.17), el de mayor duración (2.2 ± 0.9 ms), es más breve que el de la quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A} asemejándose al receptor $\alpha 7$, aunque un poco más prolongado que el receptor nativo $\alpha 7$. El histograma de cierre está formado por varios componentes con una distribución que depende de la expresión del parche.

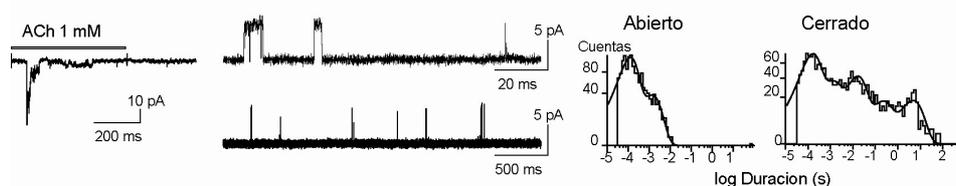


Fig. 2.17: Registros de *Patch-clamp* de la quimera *all- $\alpha 7$* . Tanto la corriente macroscópica como los canales se obtuvieron con un pulso de ACh 1 mM en la configuración *outside-out*. Izquierda: Corriente macroscópica obtenida con un potencial de membrana de -50 mV. Derecha: Trazos de canales e histogramas a un potencial de membrana de -70 mV.

Las corrientes macroscópicas presentan una rápida desensibilización ($\tau_d = 5.9 \pm 2.3$ ms; Fig. 2.17), y generalmente son pequeñas y difíciles de detectar.

En el laboratorio de Steven Sine de la Clínica Mayo (USA) se realizaron los estudios de competición de ACh con [¹²⁵I] α -BTX sobre células BOSC intactas que expresaban la quimera *all- $\alpha 7$* . Para esta quimera, el valor aparente de K_d (1.4 ± 0.4 μ M) es menor que el de $\alpha 7$ -5HT_{3A} (56 ± 4.2 μ M). Esto puede deberse a que la desensibilización es mayor para *all- $\alpha 7$* y que el estado desensibilizado es de mayor afinidad.

De esta manera, para la quimera *all- $\alpha 7$* , la cinética de las corrientes unitarias y macroscópicas se aproxima a la del receptor nACh $\alpha 7$, ya que presenta aperturas breves y una rápida desensibilización.

ii) Receptor con interfase 5-HT_{3A} (*all-5HT_{3A}*)

De la misma manera que la quimera anterior, la quimera *all-5HT_{3A}*, se construyó a partir de la quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A} reemplazando las secuencias de los *loops* del dominio extracelular por residuos de 5-HT_{3A} (Fig. 2.18). De esta manera, todos los *loops* de la interfase contienen secuencias del receptor de 5-HT_{3A}.

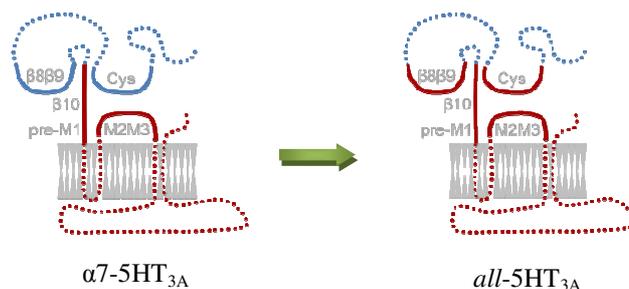


Fig. 2.18: Representación esquemática de una subunidad de las quimeras $\alpha 7$ -5HT_{3A} y *all*-5HT_{3A}. En azul, secuencias de $\alpha 7$ y en rojo, de 5-HT_{3A}.

La activación de los canales unitarios de la quimera *all*-5HT_{3A} se observa en forma de *bursts* agrupados en *clusters* (Fig. 2.19). El histograma de tiempo de estado abierto se ajusta con tres componentes como ocurre en el receptor nativo de 5-HT_{3A}. El tiempo más largo (40 ± 1 ms) es mayor que el de la quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A}. El histograma de estado cerrado presenta cinco componentes, siendo el mayoritario el más breve que corresponde a los cierres dentro de los *burst intraclusters* (Fig. 2.19). Las corrientes macroscópicas decaen lentamente de sus picos máximos ($\tau_d = 150 \pm 20$ ms; Fig. 2.19).

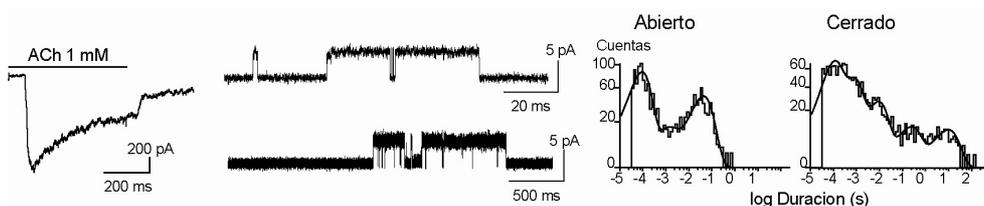


Fig. 2.19: Registros de corrientes macroscópicas y unitarias del receptor quimérico *all*-5HT_{3A}. Izquierda: Corriente obtenida en la configuración *outside-out* con un pulso de ACh 1 mM a -50 mV. Derecha: Trazos de canal único activados con ACh 500 μ M a -70 mV acompañados de los correspondientes histogramas.

A diferencia del receptor 5-HT_{3A}, la quimera *all*-5HT_{3A} exhibe aperturas breves (70 μ s) e intermedias (620 μ s) en ausencia de ACh (Fig. 2.20), indicando que la constante de equilibrio del gatillado es mayor en esta quimera que en el receptor nativo.

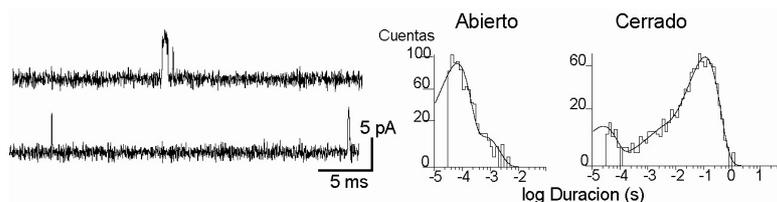


Fig. 2.20: Canales espontáneos de la quimera *all*-5HT_{3A}. Canales únicos obtenidos en la configuración *cell-attached* en ausencia de ACh a -70 mV acompañados de los correspondientes histogramas.

Nuevamente, la constante de afinidad aparente (K_d) del receptor *all-5HT_{3A}* es menor ($1.2 \pm 0.2 \mu\text{M}$) que el de la quimera $\alpha 7\text{-}5\text{HT}_{3A}$ ($56 \pm 4.2 \mu\text{M}$). Esto es esperable ya que el tiempo de apertura para esta quimera es mayor que el de la quimera $\alpha 7\text{-}5\text{HT}_{3A}$, además de presentar aperturas espontáneas.

En síntesis, la cinética de activación de la quimera *all-5HT_{3A}*, tanto en corrientes unitarias como macroscópicas, se aproxima a la del receptor nativo 5-HT_{3A} , ya que la desensibilización es lenta y los *clusters* están formados por numerosas aperturas largas.

iii) Cinética de los receptores homopentaméricos nativos y quiméricos

Para cuantificar la cinética de los receptores nativos nACh $\alpha 7$ y 5-HT_{3A} y la de las quimeras *all- $\alpha 7$* y *all-5HT_{3A}*, analizamos las duraciones de aperturas, de *burst* y de *clusters*, y el tiempo de caída debido a desensibilización (τ_d) de cada uno (Fig. 2.21).

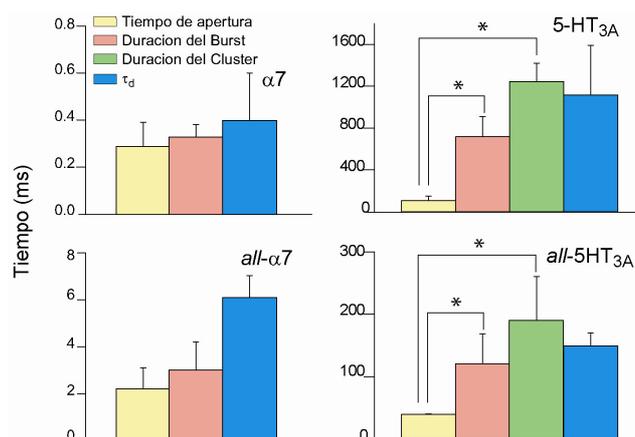


Fig. 2.21: Comparación del tiempo de estado abierto, de *burst*, de *cluster* y de decaimiento de la corriente (τ_d) entre los receptores nativos, $\alpha 7$ y 5-HT_{3A} , y las quimeras *all- $\alpha 7$* y *all-5HT_{3A}*. Los valores se muestran como la media \pm DS. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron con el test de la T de Student. * $p < 0.05$.

Para el receptor nACh $\alpha 7$, las duraciones de apertura, de *burst* y la constante de decaimiento de la corriente macroscópica (τ_d) son similares (Fig. 2.21). La duración del *burst* (0.33 ms) es similar a la constante de decaimiento de la corriente (0.4 ms). Esto se debe a que la mayoría de los *bursts* consisten en una única apertura y la desensibilización es el principal camino por el cual los canales terminan su respuesta.

En cambio, para el receptor 5-HT_{3A} el tiempo de apertura es mucho más breve que la duración del *cluster* y la constante de decaimiento (Fig. 2.21). Sin embargo, la duración del *cluster* es similar a la constante de decaimiento, indicando que los *clusters* son, en canal único, el equivalente a la desensibilización macroscópica.

Estos dos perfiles cinéticos diferentes sugieren que en la sinapsis, donde el pulso de neurotransmisor es transitorio, la respuesta del receptor $\alpha 7$ es breve mientras que la del receptor 5-HT_{3A} es prolongada. Para ambos, la duración de la respuesta estaría determinada por la desensibilización.

En la quimera *all- $\alpha 7$* , los canales no se activan en *clusters* y las duraciones de las aperturas y de los *bursts* son similares (Fig. 2.21), como se observa para el receptor nativo $\alpha 7$. Sin embargo, la constante de decaimiento de la corriente es del doble con respecto a la duración del *burst*. Esto se debería al cambio de configuración en la adquisición de canales únicos que altera la distribución de los tiempos de cierre y por ende el tiempo crítico para definir el tiempo de *burst*.

La otra quimera, *all-5HT_{3A}*, también muestra un comportamiento similar al del receptor nativo 5-HT_{3A}, el tiempo de apertura es más breve que el tiempo de *burst* y de *cluster*, y que la constante de decaimiento de la corriente. A su vez, la duración del *cluster* y la constante de decaimiento son similares (Fig. 2.21).

Cabe destacar que las diferencias entre las constantes de tiempo entre los receptores nativos y las quimeras son esperadas ya que, en las quimeras, el dominio extracelular presenta secuencias de $\alpha 7$ y el dominio transmembrana, secuencias de 5-HT_{3A}. Sin embargo, la sustitución de residuos de la interfase en la quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A} por residuos de los receptores nativos, reconstituye las propiedades fundamentales de activación y desensibilización de los receptores homopentaméricos originales.

En conclusión, la interfase entre los dominios extracelular y transmembrana no sólo acopla la unión del agonista con la apertura del poro, sino que también determina la cinética de apertura y desensibilización de los receptores homopentaméricos nACh $\alpha 7$ y 5-HT_{3A}.

3- CONTRIBUCIÓN DE LOS DIFERENTES *LOOPS* DE LA INTERFASE

Continuamos estudiando la contribución de los diferentes *loops* de la interfase entre el dominio unidor de agonista y el formador del poro iónico, en la duración de la apertura y la desensibilización de los receptores homopentaméricos.

3.1 *Loops* del dominio extracelular: Rol de los *loops* Cys- y $\beta 8\beta 9$

i) Contribución del Cys-loop

El Cys-loop se encuentra ubicado en el dominio extracelular y está formado por un puente disulfuro separado por 13 aminoácidos entre las hojas plegadas $\beta 6$ y $\beta 7$. Es el que le da nombre a toda la familia.

Para evaluar la contribución del Cys-loop en la cinética del canal, sustituimos en la quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A} la secuencia de $\alpha 7$ de este *loop* por 5-HT_{3A} (Fig. 2.22). Esta nueva quimera se llamará CH1.

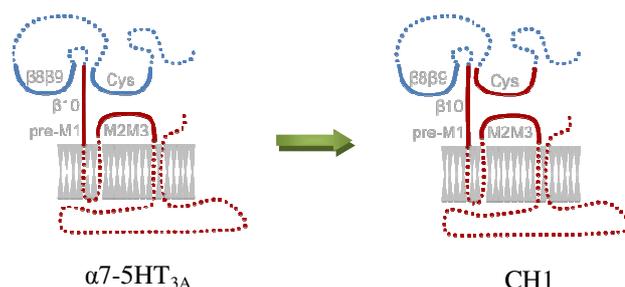


Fig. 2.22: Representación esquemática de una subunidad de las quimeras $\alpha 7$ -5HT_{3A} y CH1. En azul, secuencias de $\alpha 7$ y en rojo, de 5-HT_{3A}.

Las corrientes unitarias de esta quimera se observan en *clusters* de canales largos sucesivos (Fig. 2.23). El histograma de tiempo de estado abierto se ajusta con tres componentes. El más largo, presenta un tiempo de apertura (37 ± 3.0 ms) similar al de la quimera *all*-5HT_{3A}.

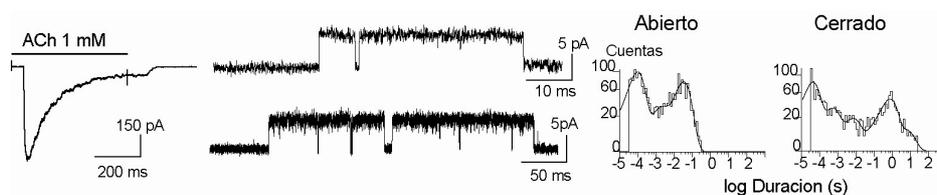


Fig. 2.23: Registros de corrientes de la quimera CH1. Izquierda: Corriente obtenida en la configuración *outside-out* con un pulso de ACh 1 mM a -50 mV. Derecha: Trazos de canal único activados con ACh 100 μ M a -70 mV acompañados de los correspondientes histogramas.

Las corrientes macroscópicas obtenidas en la configuración *outside-out* decaen lentamente ($\tau_d = 120 \pm 35$ ms; Fig. 2.23).

A pesar de que la quimera CH1 exhibe propiedades funcionales cercanas a la de la quimera *all-5HT_{3A}*, existen ciertas características que la diferencian tales como una constante de afinidad aparente mayor (menor afinidad por ACh; $K_d = 8.1 \pm 0.70$ μ M) y no presenta aperturas espontáneas.

ii) Contribución del *loop* $\beta 8\beta 9$

A continuación evaluamos la contribución de otro *loop* del dominio extracelular, el *loop* $\beta 8\beta 9$. De la misma manera que la quimera anterior, sustituimos en $\alpha 7$ -5HT_{3A} las secuencias de $\alpha 7$ presentes en el *loop* $\beta 8\beta 9$ por secuencias de 5-HT_{3A} creando la quimera CH2 (Fig. 2.24).

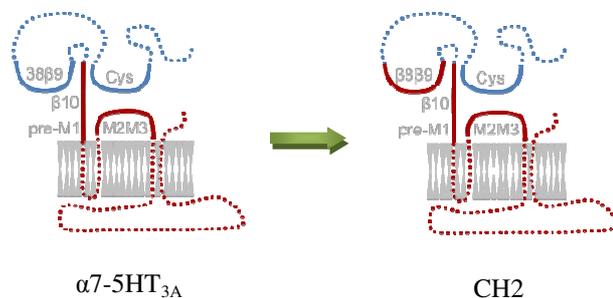


Fig. 2.24: Representación esquemática de una subunidad de las quimeras $\alpha 7$ -5HT_{3A} y CH2. En azul, secuencias de $\alpha 7$ y en rojo, de 5-HT_{3A}.

Nuevamente, los canales obtenidos en la configuración *cell-attached* se activan en *clusters* (Fig. 2.25) y el histograma de tiempo de estado abierto muestra tres componentes, el más largo es similar (41 ± 4 ms) al de la quimera *all-5HT_{3A}*. Las corrientes macroscópicas también son más lentas ($\tau_d = 280 \pm 90$ ms) que las obtenidas con $\alpha 7$ -5HT_{3A} aproximándose a la quimera *all-5HT_{3A}*.

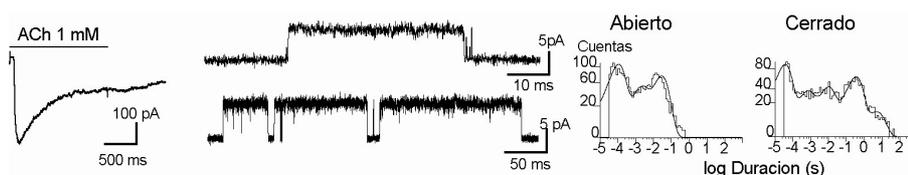


Fig. 2.25: Registros de *Patch-clamp* de la quimera CH2. Izquierda: Corriente obtenida en la configuración *whole-cell* con un pulso de ACh 1 mM a -50 mV. Derecha: Trazos de canal único activados con ACh 500 μ M a -70 mV acompañados de los correspondientes histogramas de tiempo de estado abierto y cerrado.

La quimera CH2 presenta características funcionales similares a CH1 ya que presenta aperturas largas agrupadas en *clusters* y desensibilización lenta. Se aproxima a la actividad que presenta la quimera *all-5HT*_{3A}, aunque no exhiba canales espontáneos en ausencia de agonista y tenga una afinidad menor por la ACh ($K_d = 2.6 \pm 0.10 \mu$ M).

De esta manera, mediante las quimeras CH1 y CH2, podemos ver que los *loops* Cys- y $\beta 8\beta 9$ contribuyen de manera equitativa pero no aditiva a la cinética de apertura y desensibilización del canal, y que son necesarias secuencias de 5HT_{3A} en ambos *loops* para completar el perfil funcional completo de la quimera *all-5HT*_{3A}.

3.2 *Loops* del dominio transmembrana: Rol de M1 y M2M3

i) Secuencias de $\alpha 7$ en M1 y de 5-HT_{3A} en M2M3

A continuación evaluamos la contribución del extremo N-terminal de M1 y del *linker* M2M3 en la funcionalidad del receptor.

Con este fin creamos una quimera a partir de $\alpha 7$ -5HT_{3A}, formada por residuos de $\alpha 7$ en el extremo N-terminal de M1 (quimera CH3; Fig. 2.26).

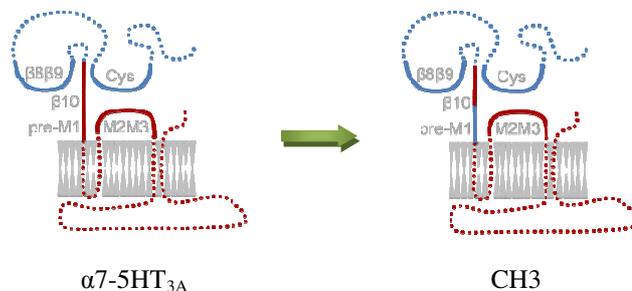


Fig. 2.26: Representación esquemática de una subunidad de las quimeras $\alpha 7$ -5HT_{3A} y CH3. En azul, secuencias de $\alpha 7$ y en rojo, de 5-HT_{3A}.

La quimera resultante CH3, tiene alta expresión en superficie celular ($84 \pm 7 \%$ respecto a la quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A}), pero ACh no produce ningún tipo de corriente en las configuraciones testeadas, es decir no es funcional (Fig. 2.28). La constante de afinidad aparente (K_d) es ligeramente superior ($80 \pm 8.7 \mu\text{M}$) a la de la quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A} ($56 \pm 4.2 \mu\text{M}$).

Se construyó a partir de la quimera CH3 una segunda quimera, conteniendo también secuencias de $\alpha 7$ en el *loop* $\beta 10$ (CH4; Fig. 2.27).

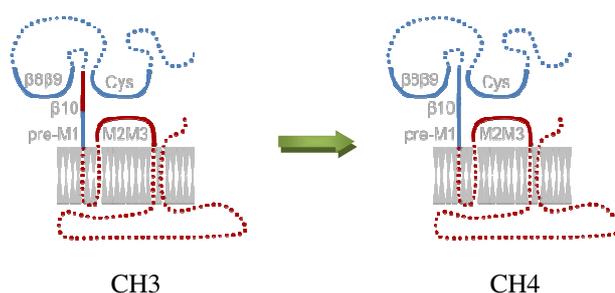


Fig. 2.27: Representación esquemática de una subunidad de las quimeras CH3 y CH4. En azul, secuencias de $\alpha 7$ y en rojo, de 5-HT_{3A}.

La quimera CH4, también expresa en superficie celular ($47 \pm 18 \%$ relativo a la quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A}) y une ACh con una K_d similar ($62 \pm 5.0 \mu\text{M}$) al de la quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A}, pero tampoco genera corrientes con ninguna de las concentraciones testadas de ACh (Fig. 2.28).

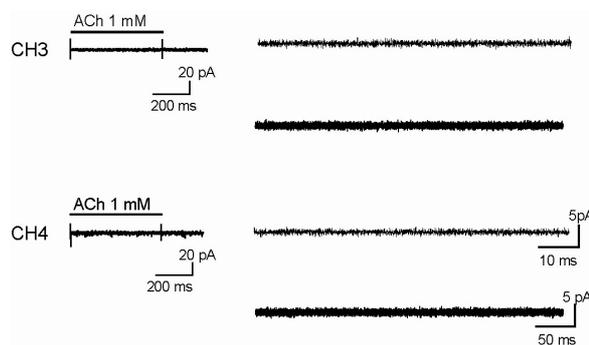


Fig. 2.28: Trazos de corrientes de las quimeras CH3 y CH4. No se observó ningún tipo de actividad en los dos tipos de configuraciones testadas, *outside-out* (izquierda) y *cell-attached* (derecha).

En ambas quimeras, CH3 y CH4, el *loop* M2M3 contiene secuencias de 5-HT_{3A}, mientras que el segmento N-terminal de M1, secuencias de $\alpha 7$, sugiriendo que la interacción estructural entre estas dos regiones desacoplaría el dominio extracelular del transmembrana. De esta manera, la unión del agonista no genera la apertura del poro iónico.

ii) Secuencias de 5-HT_{3A} en M1 y de $\alpha 7$ en M2M3

Para examinar las consecuencias funcionales de las interacciones entre el segmento N-terminal de M1 y el *linker* M2M3, construimos a partir de CH4 una quimera conteniendo en M1 secuencias de 5-HT_{3A} y en M2-M3, secuencias de $\alpha 7$ (CH5; Fig. 2.29), y otra con residuos de 5-HT_{3A} en M1 y $\beta 10$ (CH6; Fig. 2.29), para revertir la interacción de las quimeras silentes CH3 y CH4.

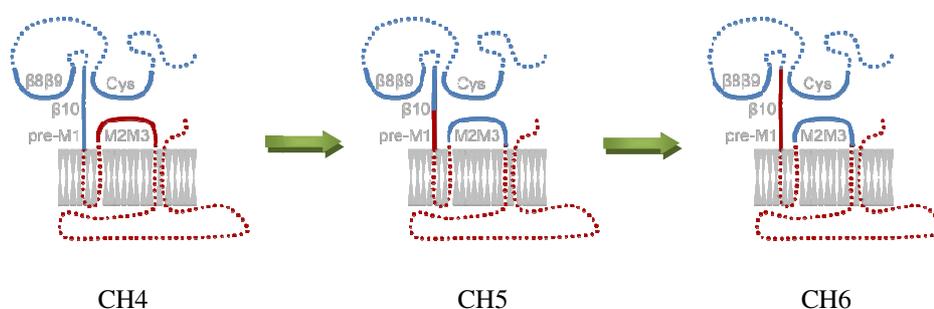


Fig. 2.29: Representación esquemática de una subunidad de las quimeras CH4, CH5 y CH6. En azul, secuencias de $\alpha 7$ y en rojo, de 5-HT_{3A}.

Las quimeras resultantes, CH5 y CH6, presentan corrientes unitarias y macroscópicas robustas en respuesta a ACh, con características funcionales similares a la quimera *all-5HT_{3A}*. Los canales se activan en *clusters* de largas aperturas (62 ± 4 y 50 ± 2 ms para CH5 y CH6, respectivamente) separadas por tiempos breves (Fig. 2.30). Los histogramas de apertura y cierre, las constantes de afinidad (3.3 ± 0.7 y 2.4 ± 0.6 μM para CH5 y CH6, respectivamente) y las aperturas espontáneas en ausencia de ACh hacen que estas dos quimeras sean funcionalmente similares a la quimera *all-5HT_{3A}*.

Las corrientes obtenidas en la configuración *outside-out* también decaen lentamente ($\tau_d = 320 \pm 60$ y 310 ± 80 ms para CH5 y CH6, respectivamente; Fig. 2.30).

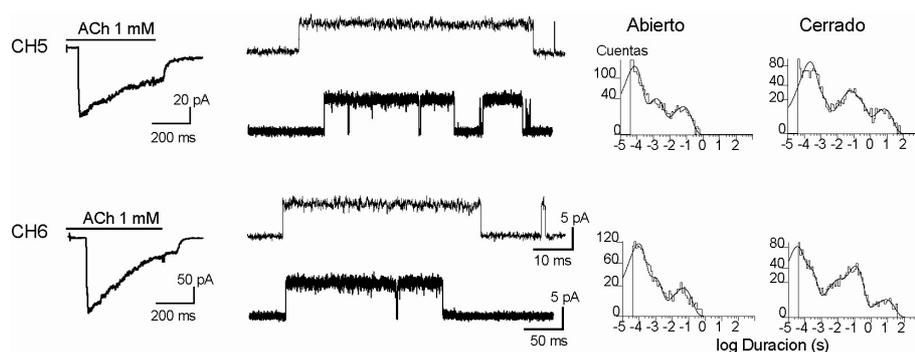


Fig. 2.30: Registros de corrientes de las quimeras CH5 y CH6. Izquierda: Corrientes obtenidas en la configuración *outside-out* con un pulso de ACh 1 mM a -50 mV. Derecha: Trazos de canal único activados con ACh 5 μ M a -70 mV acompañados de los correspondientes histogramas de tiempo de estado abierto y cerrado.

En conjunto podemos inferir que las secuencias presentes en el extremo N-terminal de M1 y el *linker* M2M3 pueden desacoplar la unión del agonista con la apertura del canal, y que la presencia de residuos de 5-HT_{3A} en pre-M1 genera aperturas largas en *clusters* y desensibilización lenta, aunque M2M3 contenga secuencias de $\alpha 7$.

iii) Secuencias de $\alpha 7$ en M1 y M2M3

Por último, creamos una quimera (CH7) sustituyendo, en la quimera CH6, las secuencias de 5-HT_{3A} en el extremo N-terminal de M1 por residuos de $\alpha 7$ (un cambio de sólo 5 aminoácidos).

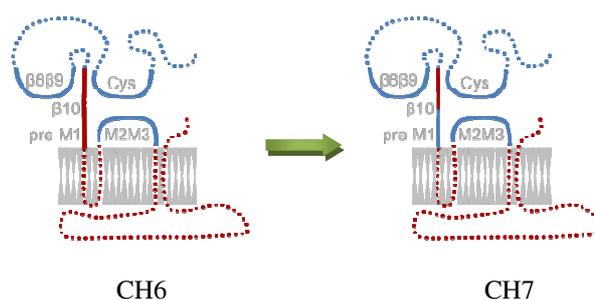


Fig. 2.31: Representación esquemática de una subunidad de las quimeras CH6 y CH7. En azul, secuencias de $\alpha 7$ y en rojo, de 5-HT_{3A}.

Obtenemos, de esta manera, una quimera con características de cinética rápida (similar al receptor nACh $\alpha 7$). Como no detectamos corrientes unitarias en la configuración *cell-attached*, registramos los canales en la configuración *outside-out*. Allí podemos ver que

las aperturas son breves (1.6 ± 0.6 ms) y se agrupan en *bursts* (Fig. 2.32), y las corrientes macroscópicas decaen rápidamente ($\tau_d = 3.4 \pm 1.5$; Fig. 2.32).

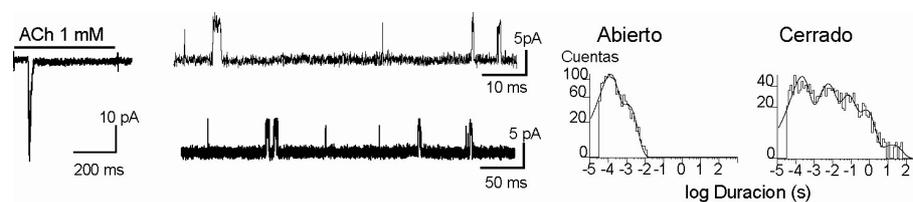


Fig. 2.32: Registros de corrientes y canal único de la quimera CH7. La corriente macroscópica y los canales se obtuvieron con un pulso de ACh 1 mM en la configuración *outside-out*. Izquierda: Corriente macroscópica obtenida con a -50 mV. Derecha: trazos de canales e histogramas a un potencial de membrana de -70 mV.

En conjunto, estos resultados revelan que distintas regiones discontinuas pero localizadas en la interfase, como los *loops* Cys-, $\beta 8\beta 9$, *linker* M2M3 y la región N-terminal de M1, interactúan entre sí de diferente manera para acoplar la unión del agonista en el dominio extracelular con la apertura del poro en el dominio transmembrana. Además definen las características de tiempo de estado abierto y desensibilización del receptor.

DISCUSIÓN

A lo largo de este capítulo se ha resaltado la importancia de la zona donde confluyen las hojas plegadas β del dominio extracelular con las hélices α del dominio transmembrana. Partimos describiendo la cinética de activación y desensibilización de dos receptores homopentaméricos: el receptor nACh $\alpha 7$ y el receptor activado por 5-hidroxitriptamina tipo 3 (5-HT₃). Y luego, mediante la creación de varios receptores quiméricos evaluamos la contribución de los diferentes *loops* de la región a la cinética de gatillado y desensibilización.

Las distintas interacciones que se producen entre el agonista y el sitio de unión se propagan hacia el poro mediante una serie de re-arreglos estructurales y cambios conformacionales que terminan con el pasaje de iones por el poro. Estos movimientos involucran a una región ubicada entre los dominios extracelular, unidor de agonista, y el transmembrana, formador del poro iónico. En este trabajo prestamos especial atención a los *loops* Cys-, $\beta 8\beta 9$, $\beta 10$, pre-M1 y M2M3 (Fig. 2.33). La contribución del *loop* $\beta 1\beta 2$ no fue evaluada ya que la secuencia de esta zona en $\alpha 7$ y 5-HT_{3A} es la misma. A pesar de esto, se

discutirá la contribución de este *loop* junto con el aporte del extremo post-M4 a la funcionalidad del receptor.

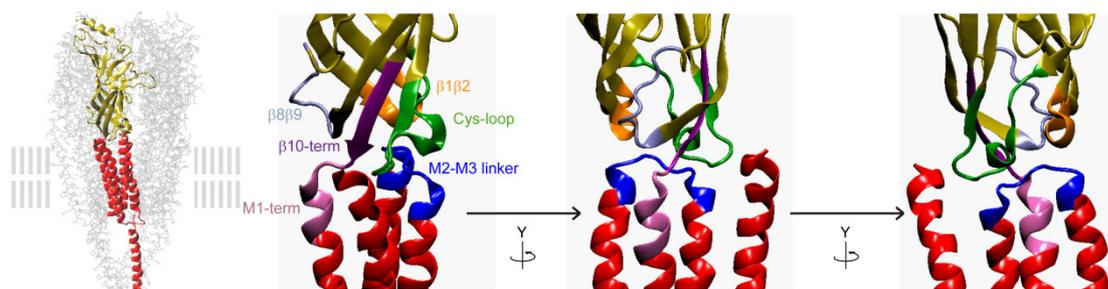


Fig. 2.33: Interfase entre los dominios extracelular y transmembrana. Izquierda: Estructura del receptor nACh de *Torpedo* con una de sus subunidades resaltada con el dominio extracelular en amarillo y el transmembrana e intracelular en rojo. Derecha: Tres diferentes vistas de la interfase rotada en el eje de las Y. Los diferentes componentes de esta región fueron coloreados en naranja ($\beta 1\beta 2$), gris ($\beta 8\beta 9$), verde (Cys-loop), violeta ($\beta 10$), rosa (pre-M1), y azul (M2-M3).

La importancia de los *loops* $\beta 1\beta 2$ y Cys- en el gatillado ha sido confirmada para todos los miembros de la familia de receptores Cys-loop (Xiu et al., 2005; Gay and Yakel, 2007; Cederholm et al., 2009; Chang et al., 2009). En cambio, es el primer reporte de la contribución del extremo M1 terminal y su dependencia con el *linker* M2M3 a la cinética de activación y desensibilización del receptor.

Activación y desensibilización en presencia de interfases con secuencias mixtas y homogéneas

La importancia de una interfase ubicada entre el dominio unidor de agonista y el formador del poro iónico con secuencias aminoacídicas compatibles fue demostrada previamente con una quimera conteniendo secuencias de la proteína unidora de ACh (AChBP) en el dominio extracelular y secuencias de 5-HT_{3A} en el dominio formador del poro iónico (Bouzat et al., 2004). Este receptor quimérico unía ACh pero no conducía iones. Únicamente cuando se reemplazaron las secuencias de los *loops* de la interfase de la AChBP por residuos de 5-HT_{3A}, la quimera fue funcional (Bouzat et al., 2004). Trabajos posteriores con quimeras también concluyeron necesaria la compatibilidad estructural de esta región (Grutter et al., 2005b; Gee et al., 2007).

Comenzamos este estudio caracterizando en detalle la forma de activación y desensibilización de dos receptores cinéticamente diferentes, el receptor nACh $\alpha 7$ y el de 5-HT_{3A}. Las corrientes macroscópicas de $\alpha 7$ decaen rápidamente indicando una desensibilización extremadamente rápida ($\tau_d \sim 0.4$ ms), y la activación de los canales ocurren como eventos aislados breves (~ 0.3 ms) y rara vez agrupados en *bursts*. Por el contrario, la constante de decaimiento del receptor 5-HT_{3A} es lenta (~ 1 s), y la activación de corrientes unitarias ocurre en aperturas largas (~ 100 ms) agrupadas en *bursts*, los cuales se fusionan formando *clusters* de gran duración.

Luego de caracterizar la cinética de activación y desensibilización de estos dos receptores, estudiamos un receptor quimérico formado por residuos de $\alpha 7$ en el dominio extracelular, y por secuencias de 5-HT_{3A} en el transmembrana (quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A}; Fig. 2.13). La secuencia de la interfase en esta nueva quimera es mixta: los *loops* Cys- y $\beta 8\beta 9$ contienen secuencias de $\alpha 7$ y los *loops* $\beta 10$, pre-M1 y M2M3, de 5-HT_{3A}. La constante de decaimiento (τ_d) de esta quimera con interfase mixta es rápida (~ 10 ms) pero no tan rápida como en $\alpha 7$, y los canales muestran aperturas intermedias (~ 6 ms) agrupadas en *bursts* de pocos canales, que no se agrupan en *clusters* como en 5-HT_{3A}, pero tampoco son breves y aislados como en $\alpha 7$. De esta manera, la quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A} muestra un perfil cinético intermedio entre los dos receptores originales.

Nuestra hipótesis fue que la cinética intermedia se debía a la interfase mixta. Para probarla creamos dos quimeras adicionales a partir de $\alpha 7$ -5HT_{3A} con interfases homogéneas con el objetivo de reproducir la forma de activación y desensibilización de los receptores originales. Una, con los *loops* de esta región conteniendo únicamente residuos de $\alpha 7$ (*all- $\alpha 7$*), y otra con residuos sólo de 5-HT_{3A} (*all-5HT_{3A}*). Las corrientes macroscópicas y unitarias de *all- $\alpha 7$* se aproximan a las del receptor $\alpha 7$, exhibiendo desensibilización rápida y aperturas breves agrupadas en *bursts*. De manera análoga, el perfil cinético de *all-5HT_{3A}* se aproxima al del receptor de 5-HT_{3A}, exhibiendo desensibilización lenta y *clusters* de largas aperturas. Se esperaban diferencias cuantitativas entre estos receptores quiméricos y los originales ya que los primeros contienen secuencias de $\alpha 7$ en el dominio unidor de agonista y de 5-HT_{3A} en los dominios formador del poro iónico y citoplasmático. A pesar de esto, la sustitución de los residuos de la interfase entre ambos dominios de la quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A} reconstituye las propiedades fundamentales de activación y desensibilización de los receptores originales.

En conclusión, la interfase ubicada entre los dos dominios principales del receptor no sólo está involucrada en el acoplamiento de la unión del agonista con la apertura del poro iónico, sino que además determina la duración de los tiempos de apertura y desensibilización

del receptor. De esta manera, la interfase gobernaría también la duración de la respuesta sináptica y en el período refractario.

Función de los distintos *loops* que componen la interfase

Los diferentes *loops* de la interfase contribuyen a las características funcionales típicas del receptor dependiendo del tipo de secuencias presentes en los distintos sectores de esta región.

Existen numerosos trabajos que aportan información acerca del rol de la interfase en el acoplamiento de la unión del agonista con la apertura del poro (Bouzat et al., 2004; Lee and Sine, 2005; Xiu et al., 2005; Bouzat et al., 2008; Cheng et al., 2009; Cederholm et al., 2009; Taly et al., 2009; Bartos et al., 2009a). En este trabajo vimos que la interfase entre los dominios extracelular y transmembrana puede ser modificada de manera tal que se generen distintos tiempos de estado abierto y velocidades de desensibilización, y que estos cambios ocurren en paralelo y contribuyen a la finalización de la respuesta sináptica.

El acoplamiento de la unión del agonista con el gatillado del canal que lleva a la apertura del poro iónico requiere cambios estructurales coordinados de los múltiples *loops* que forman la interfase, además de una compatibilidad estructural entre ellos (Bouzat et al., 2004; Bouzat et al., 2008). La necesidad de compatibilidad estructural sugiere que la contribución funcional de cada *loop* depende en gran medida de la interacción con los demás segmentos de la región. En los últimos años surgieron trabajos que apoyan esta teoría, mediante el estudio del acoplamiento energético de pares de residuos provenientes de diversos *loops* de la interfase (Lee and Sine, 2005; Lee et al., 2009).

En este trabajo demostramos que las contribuciones funcionales de los *loops* Cys- y $\beta 8\beta 9$, del extremo N-terminal de M1 y M2M3 dependen de las secuencias de los otros *loops* presentes en la región (Fig. 2.34). Estructuras adicionales de la periferia de la interfase, como las hélices α del extremo C-terminal de M4, podrían potencialmente contribuir a esta interacción funcional (Xiu et al., 2005). Si estas estructuras contribuyen o no al tiempo de estado abierto y a la desensibilización quedará para futuros estudios.

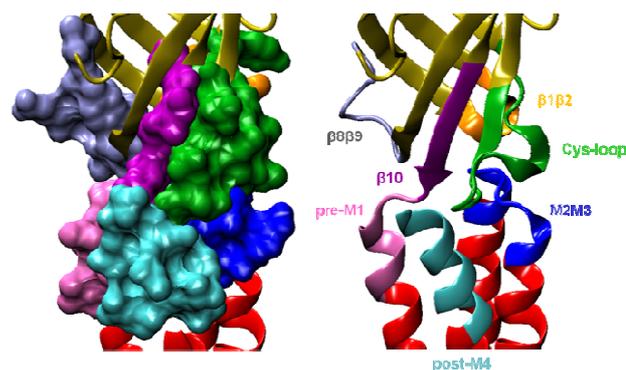


Fig. 2.34: Interfase entre el dominio unidor de agonista y el formador del poro iónico. Representación en superficie (izquierda) y esquema (derecha). Los distintos componentes están coloreados en naranja ($\beta 1\beta 2$), gris ($\beta 8\beta 9$), verde (Cys-loop), violeta ($\beta 10$), rosa (pre-M1), azul (M2-M3) y celeste (post-M4).

i) *Loops* del dominio extracelular: Rol de los *loops* Cys- y $\beta 8\beta 9$

En este trabajo vimos cómo dos *loops* del dominio unidor de ACh, Cys- y $\beta 8\beta 9$, contribuyen al tiempo de estado abierto y a la velocidad de desensibilización del canal de una manera no aditiva. El reemplazo de secuencias de $\alpha 7$ en la quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A} por residuos de 5-HT_{3A} en uno o ambos *loops* prolonga el tiempo de estado abierto y enlentece la desensibilización.

El Cys-loop, estructura característica de toda la familia, está altamente involucrado en el acoplamiento estructural de los dominios extracelular y transmembrana (Chakrapani et al., 2004; Xiu et al., 2005; Lee et al., 2009). Se ubica entre la región pre-M1 y el *linker* M2M3 (Fig. 2.33). Dentro de este *loop*, uno de los residuos candidatos involucrados en la transducción de la señal es Asp138. Este podría interactuar electrostáticamente con la Arg429 de post-M4 (Xiu et al., 2005).

El *loop* $\beta 8\beta 9$ está localizado cerca del dominio transmembrana entre el *loop* $\beta 1\beta 2$ y pre-M1 (Fig. 2.33) (Unwin, 2005). El estudio con quimeras determinó indispensable la contribución de este *loop* a las propiedades funcionales del canal (Bouzat et al., 2004). Su rol no es del todo claro ya que la secuencia aminoacídica de esta región es la más variable de toda la familia Cys-loop (Law et al., 2005). Uno de los residuos candidatos involucrados en los movimientos producidos durante la activación del receptor es Glu172 (Galzi et al., 1996).

Los *loops* Cys- y $\beta 8\beta 9$ no hacen contacto físico, por lo tanto, las bases estructurales de la contribución no aditiva resultaría de la interacción de estos *loops* con estructuras comunes a ambos. La cadena $\beta 10$, localizada entre ambos *loops* (Fig. 2.33), jugaría un rol clave en el correcto funcionamiento de la región. De hecho, en estudios previos, reportaron a la Arg209 (residuo del *loop* $\beta 10$) como residuo clave en la activación del receptor (Lee and Sine, 2005;

Sine and Engel, 2006). De esta manera, los *loops* Cys- y $\beta 8\beta 9$ podrían modular la cadena $\beta 10$, convirtiéndola en un determinante clave del tiempo de estado abierto y desensibilización del canal.

ii) *Loops* del dominio transmembrana: Rol de M1 y M2M3

Este estudio también revela la contribución del extremo N-terminal de M1 y su relación de dependencia con las secuencias presentes en los demás *loops* sobre todo las de M2M3. Si pre-M1 contiene secuencias de $\alpha 7$ y M2M3, de 5-HT_{3A}, se interrumpe el acoplamiento entre la unión del neurotransmisor y la apertura del poro iónico, quedando de manifiesto que pre-M1 es selectivamente permisivo a la respuesta mediada por el agonista. Por el contrario, si M1 contiene residuos de 5-HT_{3A}, se genera una respuesta prolongada luego de la unión del agonista, independientemente de que M2M3 contenga secuencias de $\alpha 7$ o de 5-HT_{3A}. De esta manera, la habilidad del agonista de iniciar una respuesta depende de la combinación de secuencias en pre-M1 y en M2M3.

La región pre-M1 (muchas veces nombrada como $\beta 10$) está conectada al *loop* C del sitio de unión de agonistas mediante el *loop* $\beta 10$ (Fig. 2.33) y contiene varios residuos de arginina conservados a lo largo de la familia Cys-loop. La Arg209, cumple un rol clave en el gatillado del receptor nACh muscular (Lee and Sine, 2005). Uno de los mecanismos postulados para el gatillado es la ruptura de un puente hidrógeno formado entre esta arginina y el residuo Glu45 del *loop* $\beta 1\beta 2$. Luego, la Val46 de $\beta 1\beta 2$ se acoplaría energéticamente a los residuos Pro272 y Ser269 de M2M3 (Lee and Sine, 2005). Otro mecanismo propuesto, postula que la región de pre-M1 se acoplaría a M2M3 mediante el Cys-loop (Lee et al., 2009). En conjunto, estos estudios realizados en el receptor nACh muscular muestran que pre-M1 estaría acoplado a M2M3 por medio de $\beta 1\beta 2$ y Cys-loop.

Una de las primeras regiones estudiadas involucrada en el gatillado del canal fue la del *linker* M2M3. Existen numerosos residuos de M2M3 involucrados en la transducción de la señal (Lee and Sine, 2005; Lummis et al., 2005; Lee et al., 2009). Un mecanismo postula que la Pro272 se isomerizaría de *trans* a *cis* moviendo el segmento M2 para permitir el pasaje de iones (Lummis et al., 2005; Melis et al., 2009). Este mecanismo no se cumple en todos los miembros de la familia Cys-loop (Paulsen et al., 2009). A pesar de esto, queda claro que el *linker* M2M3 cumple un rol fundamental en la interfase. Varias mutaciones naturales que ocurren en esta región resultan en enfermedades humanas hereditarias (Elmslie et al., 1996).

La región pre-M1 se encuentra estructuralmente próxima al *loop* M2M3 de la subunidad adyacente (Fig. 2.35) (Unwin, 2005), sugiriendo que estas dos regiones podrían estar en contacto directo. Dentro de una misma subunidad, estas dos regiones podrían interactuar mediante una tercera estructura (Fig. 2.33), como el *loop* $\beta 1\beta 2$ (Lee and Sine, 2005) o el Cys-loop (Lee et al., 2009). Los residuos de estas regiones constituyen un punto de partida para investigar las posibles interacciones entre pre-M1 y M2M3. Los posibles puntos de contacto según la estructura en PDB 2BG9 del receptor de *Torpedo* propuesto por Unwin (2005) se muestran en la siguiente figura (Fig. 2.35):

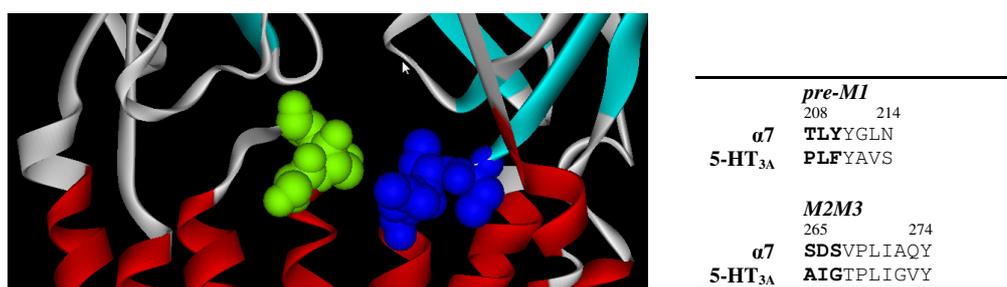


Fig. 2.34: Posibles puntos de contacto entre pre-M1 (azul) y M2M3 (verde) de dos subunidades adyacentes. Izquierda: Representación esquemática según la estructura PDB 2BG9. Derecha: Secuencias alineadas mostrando los residuos involucrados.

Demostramos que las secuencias presentes en pre-M1 son decisivas en la cinética de apertura y desensibilización del canal. Si esta región contiene secuencias de 5-HT_{3A}, el tiempo de estado abierto es largo y la desensibilización lenta, independientemente si los residuos de M2M3 son de $\alpha 7$ o de 5-HT_{3A}. Sin embargo, la contribución de residuos de 5-HT_{3A} en pre-M1 no es absoluta, ya que está modulada por los *loops* vecinos, por ejemplo en la quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A}, donde el tiempo de estado abierto y la desensibilización son intermedios.

Actualmente las interacciones puntuales entre pre-M1 y M2M3 continúan en estudio ya que posiblemente otras regiones como $\beta 1\beta 2$ y Cys-loop estén participando.

Conclusiones finales

El surgimiento de la estructura de la AChBP (Brejc et al., 2001) y luego la del receptor nACh de *Torpedo* (Unwin, 2005) han facilitado la tarea de identificar los elementos involucrados en los cambios producidos por la unión del neurotransmisor. Sin embargo, dado que estos

modelos son estructuras rígidas y no moléculas dinámicas, sirven para elegir estructuras que luego deben ser evaluadas experimentalmente.

Una vez determinada que la compatibilidad estructural es necesaria en la interfase ubicada entre los dominios extracelular y transmembrana para acoplar la unión del agonista con la apertura del poro iónico (Bouzat et al., 2004), establecimos que el tipo de secuencias presentes en esta región determina además, el tiempo de estado abierto y desensibilización del canal. Pudimos reproducir en quimeras dos tipos de cinética muy diferentes, como son la de los receptores $\alpha 7$ y 5-HT_{3A}, reemplazando secuencias de la interfase por la de los receptores originales. Además establecimos la contribución no aditiva de dos *loops* del dominio extracelular (Cys- y $\beta 8\beta 9$), y la relación entre pre-M1 y M2M3. Estas cuatro regiones de la interfase forman una red estructural que determina la vida útil del receptor activado así también como la duración de la latencia entre respuestas sinápticas.

CONCLUSIONES FINALES DEL CAPÍTULO II

- ✘ **La interfase ubicada entre el dominio unidor de agonista y el dominio formador del poro iónico acopla la unión del agonista con la apertura del poro iónico y determina la cinética de apertura y desensibilización de receptores homopentaméricos.**
- ✘ La activación del receptor nACh $\alpha 7$ es en forma de canales breves y principalmente aislados, y las corrientes macroscópicas se desensibilizan rápidamente.
- ✘ Por el contrario, los canales únicos del receptor 5-HT_{3A} presentan tiempos de estado abierto prolongados y se agrupan en largos *clusters*. Las corrientes se desensibilizan lentamente.
- ✘ El receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT_{3A}, que posee una interfase mixta formada por *loops* con secuencias de $\alpha 7$ y de 5-HT_{3A}, exhibe propiedades funcionales intermedias entre los dos receptores originales.
- ✘ Si la interfase de esa quimera es reemplazada por secuencias de $\alpha 7$, el receptor quimérico resultante presenta canales breves y desensibilización rápida, semejante al receptor nativo $\alpha 7$. De la misma manera, si se reemplaza por secuencias de 5-HT_{3A}, los canales son largos y la desensibilización lenta, similar al receptor de 5-HT_{3A}. De esta forma, las cinéticas de los receptores nativos son determinadas por la interfase.
- ✘ Los *loops* Cys- y $\beta 8\beta 9$ del dominio extracelular, contribuyen al tiempo medio de estado abierto y a la constante de desensibilización de una manera no aditiva, posiblemente interaccionando con la cadena $\beta 10$.
- ✘ La región pre-M1 interaccionaría, directa o indirectamente, con M2M3. Si pre-M1 contiene secuencias de $\alpha 7$ y M2M3, de 5-HT_{3A}, se desacopla la unión del agonista con la apertura del poro (CH3 y CH4); pero si en M2M3 existen residuos de $\alpha 7$ (CH7) se reproduce la activación de $\alpha 7$. En cambio, si pre-M1 contiene secuencias de 5-HT_{3A} los canales son largos y la desensibilización es lenta independientemente de las secuencias presentes en M2M3.

- ✘ Estos resultados revelan que distintas regiones discontinuas pero localizadas en la interfase, como los *loops* Cys-, $\beta 8\beta 9$, el *linker* M2M3 y N-terminal de M1, interaccionan entre sí formando una compleja red de comunicación que traduce los mensajes del sitio de unión de agonistas a la compuerta del receptor.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Absalom NL, Schofield P R and Lewis T M (2009) Pore Structure of the Cys-Loop Ligand-Gated Ion Channels. *Neurochem Res* **34**:1805-1815.
- Ackermann EJ and Taylor P (1997) Nonidentity of the Alpha-Neurotoxin Binding Sites on the Nicotinic Acetylcholine Receptor Revealed by Modification in Alpha-Neurotoxin and Receptor Structures. *Biochemistry* **36**:12836-12844.
- Akk G, Milescu L S and Heckmann M (2005) Activation of Heteroliganded Mouse Muscle Nicotinic Receptors. *J Physiol* **564**:359-376.
- Albuquerque EX, Pereira E F, Alkondon M and Rogers S W (2009) Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiol Rev* **89**:73-120.
- Arias HR, Bhumireddy P and Bouzat C (2006a) Molecular Mechanisms and Binding Site Locations for Noncompetitive Antagonists of Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Int J Biochem Cell Biol* **38**:1254-1276.
- Arias HR, Bhumireddy P, Spitzmaul G, Trudell J R and Bouzat C (2006b) Molecular Mechanisms and Binding Site Location for the Noncompetitive Antagonist Crystal Violet on Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Biochemistry* **45**:2014-2026.
- Arias HR, Gumilar F, Rosenberg A, Targowska-Duda K M, Feuerbach D, Jozwiak K, Moaddel R, Wainer I W and Bouzat C (2009) Interaction of Bupropion With Muscle-Type Nicotinic Acetylcholine Receptors in Different Conformational States. *Biochemistry* **48**:4506-4518.
- Auerbach A and Akk G (1998) Desensitization of Mouse Nicotinic Acetylcholine Receptor Channels. A Two-Gate Mechanism. *J Gen Physiol* **112**:181-197.
- Barnard EA, Coates V, Dolly J O and Mallick B (1977) Binding of Alpha-Bungarotoxin and Cholinergic Ligands to Acetylcholine Receptors in the Membrane of Skeletal Muscle. *Cell Biol Int Rep* **1**:99-106.
- Bartos M, Corradi J and Bouzat C (2009a) Structural Basis of Activation of Cys-Loop Receptors: the Extracellular-Transmembrane Interface As a Coupling Region. *Mol Neurobiol*.
- Bartos M, Price K L, Lummis S C and Bouzat C (2009b) Glutamine 57 at the Complementary Binding Site Face Is a Key Determinant of Morantel Selectivity for {Alpha}7 Nicotinic Receptors. *J Biol Chem* **284**:21478-21487.
- Bartos M, Rayes D and Bouzat C (2006b) Molecular Determinants of Pyrantel Selectivity in Nicotinic Receptors. *Mol Pharmacol* **70**:1307-1318.
- Bartos M, Rayes D and Bouzat C (2006a) Molecular Determinants of Pyrantel Selectivity in Nicotinic Receptors. *Mol Pharmacol* **70**:1307-1318.
- Beckstein O and Sansom M S (2006) A Hydrophobic Gate in an Ion Channel: the Closed State of the Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Phys Biol* **3**:147-159.

- Beg AA and Jorgensen E M (2003) EXP-1 Is an Excitatory GABA-Gated Cation Channel. *Nat Neurosci* **6**:1145-1152.
- Bertrand D and Gopalakrishnan M (2007) Allosteric Modulation of Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Biochem Pharmacol* **74**:1155-1163.
- Bjorn H, Roepstorff A, Waller P J and Nansen P (1990) Resistance to Levamisole and Cross-Resistance Between Pyrantel and Levamisole in *Oesophagostomum Quadrispinulatum* and *Oesophagostomum Dentatum* of Pigs. *Vet Parasitol* **37**:21-30.
- Bocquet N, Nury H, Baaden M, Le P C, Changeux J P, Delarue M and Corringer P J (2009) X-Ray Structure of a Pentameric Ligand-Gated Ion Channel in an Apparently Open Conformation. *Nature* **457**:111-114.
- Bocquet N, Prado de C L, Cartaud J, Neyton J, Le P C, Taly A, Grutter T, Changeux J P and Corringer P J (2007) A Prokaryotic Proton-Gated Ion Channel From the Nicotinic Acetylcholine Receptor Family. *Nature* **445**:116-119.
- Boulin T, Gielen M, Richmond J E, Williams D C, Paoletti P and Bessereau J L (2008) Eight Genes Are Required for Functional Reconstitution of the *Caenorhabditis Elegans* Levamisole-Sensitive Acetylcholine Receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:18590-18595.
- Bouzat C, Barrantes F and Sine S (2000) Nicotinic Receptor Fourth Transmembrane Domain: Hydrogen Bonding by Conserved Threonine Contributes to Channel Gating Kinetics. *J Gen Physiol* **115**:663-672.
- Bouzat C, Bartos M, Corradi J and Sine S M (2008) The Interface Between Extracellular and Transmembrane Domains of Homomeric Cys-Loop Receptors Governs Open-Channel Lifetime and Rate of Desensitization. *J Neurosci* **28**:7808-7819.
- Bouzat C, Bren N and Sine S M (1994) Structural Basis of the Different Gating Kinetics of Fetal and Adult Acetylcholine Receptors. *Neuron* **13**:1395-1402.
- Bouzat C, Gumilar F, del Carmen E M and Sine S M (2002) Subunit-Selective Contribution to Channel Gating of the M4 Domain of the Nicotinic Receptor. *Biophys J* **82**:1920-1929.
- Bouzat C, Gumilar F, Spitzmaul G, Wang H L, Rayes D, Hansen S B, Taylor P and Sine S M (2004) Coupling of Agonist Binding to Channel Gating in an ACh-Binding Protein Linked to an Ion Channel. *Nature* **430**:896-900.
- Brandl M, Weiss M S, Jabs A, Suhnel J and Hilgenfeld R (2001) C-H...Pi-Interactions in Proteins. *J Mol Biol* **307**:357-377.
- Brejck K, van Dijk W J, Klaassen R V, Schuurmans M, van Der O J, Smit A B and Sixma T K (2001) Crystal Structure of an ACh-Binding Protein Reveals the Ligand-Binding Domain of Nicotinic Receptors. *Nature* **411**:269-276.
- Bruneau E and Akaaboune M (2007) The Dynamics of the Rapsyn Scaffolding Protein at Individual Acetylcholine Receptor Clusters. *J Biol Chem* **282**:9932-9940.

- Burden SJ, DePalma R L and Gottesman G S (1983) Crosslinking of Proteins in Acetylcholine Receptor-Rich Membranes: Association Between the Beta-Subunit and the 43 Kd Subs synaptic Protein. *Cell* **35**:687-692.
- Cederholm JM, Schofield P R and Lewis T M (2009) Gating Mechanisms in Cys-Loop Receptors. *Eur Biophys J*.
- Celie PH, van Rossum-Fikkert S E, van Dijk W J, Brejc K, Smit A B and Sixma T K (2004) Nicotine and Carbamylcholine Binding to Nicotinic Acetylcholine Receptors As Studied in AChBP Crystal Structures. *Neuron* **41**:907-914.
- Chakrapani S, Bailey T D and Auerbach A (2004) Gating Dynamics of the Acetylcholine Receptor Extracellular Domain. *J Gen Physiol* **123**:341-356.
- Chang YC, Wu W, Zhang J L and Huang Y (2009) Allosteric Activation Mechanism of the Cys-Loop Receptors. *Acta Pharmacol Sin* **30**:663-672.
- Changeux J and Edelstein S J (2001) Allosteric Mechanisms in Normal and Pathological Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Curr Opin Neurobiol* **11**:369-377.
- Changeux JP and Taly A (2008) Nicotinic Receptors, Allosteric Proteins and Medicine. *Trends Mol Med* **14**:93-102.
- Cheng X, Ivanov I, Wang H, Sine S M and McCammon J A (2007) Nanosecond-Timescale Conformational Dynamics of the Human Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Biophys J* **93**:2622-2634.
- Cheng X, Ivanov I, Wang H, Sine S M and McCammon J A (2009) Molecular-Dynamics Simulations of ELIC-a Prokaryotic Homologue of the Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Biophys J* **96**:4502-4513.
- Cheng X, Wang H, Grant B, Sine S M and McCammon J A (2006) Targeted Molecular Dynamics Study of C-Loop Closure and Channel Gating in Nicotinic Receptors. *PLoS Comput Biol* **2**:e134.
- Chiara DC, Xie Y and Cohen J B (1999) Structure of the Agonist-Binding Sites of the Torpedo Nicotinic Acetylcholine Receptor: Affinity-Labeling and Mutational Analyses Identify Gamma Tyr-111/Delta Arg-113 As Antagonist Affinity Determinants. *Biochemistry* **38**:6689-6698.
- Collingridge GL, Olsen R W, Peters J and Spedding M (2009) A Nomenclature for Ligand-Gated Ion Channels. *Neuropharmacology* **56**:2-5.
- Colquhoun D (1998) Binding, Gating, Affinity and Efficacy: the Interpretation of Structure-Activity Relationships for Agonists and of the Effects of Mutating Receptors. *Br J Pharmacol* **125**:924-947.
- Conti-Fine BM, Navaneetham D, Lei S and Maus A D (2000) Neuronal Nicotinic Receptors in Non-Neuronal Cells: New Mediators of Tobacco Toxicity? *Eur J Pharmacol* **393**:279-294.
- Corradi J, Gumilar F and Bouzat C (2009) Single-Channel Kinetic Analysis for Activation and Desensitization of Homomeric 5-HT(3)A Receptors. *Biophys J* **97**:1335-1345.

- Culetto E, Baylis H A, Richmond J E, Jones A K, Fleming J T, Squire M D, Lewis J A and Sattelle D B (2004) The *Caenorhabditis Elegans* Unc-63 Gene Encodes a Levamisole-Sensitive Nicotinic Acetylcholine Receptor Alpha Subunit. *J Biol Chem* **279**:42476-42483.
- Dale VM and Martin R J (1995) Oxantel-Activated Single Channel Currents in the Muscle Membrane of *Ascaris Suum*. *Parasitology* **110** (Pt 4):437-448.
- Dani JA and Bertrand D (2007) Nicotinic Acetylcholine Receptors and Nicotinic Cholinergic Mechanisms of the Central Nervous System. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**:699-729.
- De Rosa MJ, Esandi M C, Garelli A, Rayes D and Bouzat C (2005) Relationship Between Alpha 7 NACHR and Apoptosis in Human Lymphocytes. *J Neuroimmunol* **160**:154-161.
- DEL CASTILLO L. and Katz B (1957) A Study of Curare Action With an Electrical Micromethod. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **146**:339-356.
- Dellisanti CD, Yao Y, Stroud J C, Wang Z Z and Chen L (2007) Crystal Structure of the Extracellular Domain of NACHR Alpha1 Bound to Alpha-Bungarotoxin at 1.94 Å Resolution. *Nat Neurosci* **10**:953-962.
- Dilger JP (2002) The Effects of General Anaesthetics on Ligand-Gated Ion Channels. *Br J Anaesth* **89**:41-51.
- Dilger JP and Liu Y (1992) Desensitization of Acetylcholine Receptors in BC3H-1 Cells. *Pflugers Arch* **420**:479-485.
- Dougherty DA (2007) Cation-Pi Interactions Involving Aromatic Amino Acids. *J Nutr* **137**:1504S-1508S.
- Eisele JL, Bertrand S, Galzi J L, villers-Thierry A, Changeux J P and Bertrand D (1993) Chimaeric Nicotinic-Serotonergic Receptor Combines Distinct Ligand Binding and Channel Specificities. *Nature* **366**:479-483.
- Elmslie FV, Hutchings S M, Spencer V, Curtis A, Covanis T, Gardiner R M and Rees M (1996) Analysis of GLRA1 in Hereditary and Sporadic Hyperekplexia: a Novel Mutation in a Family Cosegregating for Hyperekplexia and Spastic Paraparesis. *J Med Genet* **33**:435-436.
- Engel AG, Shen X M, Selcen D and Sine S M (2009) What Have We Learned From the Congenital Myasthenic Syndromes. *J Mol Neurosci*.
- Evans AM and Martin R J (1996) Activation and Cooperative Multi-Ion Block of Single Nicotinic-Acetylcholine Channel Currents of *Ascaris* Muscle by the Tetrahydropyrimidine Anthelmintic, Morantel. *Br J Pharmacol* **118**:1127-1140.
- Faghih R, Gfesser G A and Gopalakrishnan M (2007) Advances in the Discovery of Novel Positive Allosteric Modulators of the Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Recent Pat CNS Drug Discov* **2**:99-106.
- Froehner SC (1991) The Submembrane Machinery for Nicotinic Acetylcholine Receptor Clustering. *J Cell Biol* **114**:1-7.

- Gahring LC and Rogers S W (2005) Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Expression and Function on Nonneuronal Cells. *AAPS J* **7**:E885-E894.
- Galzi JL, Bertrand S, Corringer P J, Changeux J P and Bertrand D (1996) Identification of Calcium Binding Sites That Regulate Potentiation of a Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor. *EMBO J* **15**:5824-5832.
- Gay EA and Yakel J L (2007) Gating of Nicotinic ACh Receptors; New Insights into Structural Transitions Triggered by Agonist Binding That Induce Channel Opening. *J Physiol* **584**:727-733.
- Gee VJ, Kracun S, Cooper S T, Gibb A J and Millar N S (2007) Identification of Domains Influencing Assembly and Ion Channel Properties in Alpha 7 Nicotinic Receptor and 5-HT3 Receptor Subunit Chimaeras. *Br J Pharmacol* **152**:501-512.
- Gilhus NE (2009) Autoimmune Myasthenia Gravis. *Expert Rev Neurother* **9**:351-358.
- Gotti C and Clementi F (2004) Neuronal Nicotinic Receptors: From Structure to Pathology. *Prog Neurobiol* **74**:363-396.
- Gotti C, Moretti M, Gaimarri A, Zanardi A, Clementi F and Zoli M (2007) Heterogeneity and Complexity of Native Brain Nicotinic Receptors. *Biochem Pharmacol* **74**:1102-1111.
- Grutter T, de Carvalho L P, Dufresne V, Taly A, Edelstein S J and Changeux J P (2005a) Molecular Tuning of Fast Gating in Pentameric Ligand-Gated Ion Channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:18207-18212.
- Grutter T, Prado de C L, Le N N, Corringer P J, Edelstein S and Changeux J P (2003) An H-Bond Between Two Residues From Different Loops of the Acetylcholine Binding Site Contributes to the Activation Mechanism of Nicotinic Receptors. *EMBO J* **22**:1990-2003.
- Grutter T, Prado de C L, Virginie D, Taly A, Fischer M and Changeux J P (2005b) A Chimera Encoding the Fusion of an Acetylcholine-Binding Protein to an Ion Channel Is Stabilized in a State Close to the Desensitized Form of Ligand-Gated Ion Channels. *C R Biol* **328**:223-234.
- Gumilar F and Bouzat C (2008) Tricyclic Antidepressants Inhibit Homomeric Cys-Loop Receptors by Acting at Different Conformational States. *Eur J Pharmacol* **584**:30-39.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B and Sigworth F J (1981) Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording From Cells and Cell-Free Membrane Patches. *Pflugers Arch* **391**:85-100.
- Hilf RJ and Dutzler R (2008) X-Ray Structure of a Prokaryotic Pentameric Ligand-Gated Ion Channel. *Nature* **452**:375-379.
- Hilf RJ and Dutzler R (2009a) A Prokaryotic Perspective on Pentameric Ligand-Gated Ion Channel Structure. *Curr Opin Struct Biol* **19**:418-424.
- Hilf RJ and Dutzler R (2009b) Structure of a Potentially Open State of a Proton-Activated Pentameric Ligand-Gated Ion Channel. *Nature* **457**:115-118.

- Hogg RC and Bertrand D (2007) Partial Agonists As Therapeutic Agents at Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Biochem Pharmacol* **73**:459-468.
- Huganir RL, Delcour A H, Greengard P and Hess G P (1986) Phosphorylation of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Regulates Its Rate of Desensitization. *Nature* **321**:774-776.
- Ivanov I, Cheng X, Sine S M and McCammon J A (2007) Barriers to Ion Translocation in Cationic and Anionic Receptors From the Cys-Loop Family. *J Am Chem Soc* **129**:8217-8224.
- Jha A, Cadugan D J, Purohit P and Auerbach A (2007) Acetylcholine Receptor Gating at Extracellular Transmembrane Domain Interface: the Cys-Loop and M2-M3 Linker. *J Gen Physiol* **130**:547-558.
- Jones AK and Sattelle D B (2004) Functional Genomics of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Gene Family of the Nematode, *Caenorhabditis Elegans*. *Bioessays* **26**:39-49.
- Jones AK and Sattelle D B (2008) The Cys-Loop Ligand-Gated Ion Channel Gene Superfamily of the Nematode, *Caenorhabditis Elegans*. *Invert Neurosci* **8**:41-47.
- Kalamida D, Poulas K, Avramopoulou V, Fostieri E, Lagoumintzis G, Lazaridis K, Sideri A, Zouridakis M and Tzartos S J (2007) Muscle and Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. Structure, Function and Pathogenicity. *FEBS J* **274**:3799-3845.
- Kaminsky R, Ducray P, Jung M, Clover R, Rufener L, Bouvier J, Weber S S, Wenger A, Wieland-Berghausen S, Goebel T, Gauvry N, Pautrat F, Skripsky T, Froelich O, Komoin-Oka C, Westlund B, Sluder A and Maser P (2008a) A New Class of Anthelmintics Effective Against Drug-Resistant Nematodes. *Nature* **452**:176-180.
- Kaminsky R, Gauvry N, Schorderet W S, Skripsky T, Bouvier J, Wenger A, Schroeder F, Desaulles Y, Hotz R, Goebel T, Hosking B C, Pautrat F, Wieland-Berghausen S and Ducray P (2008b) Identification of the Amino-Acetonitrile Derivative Monepantel (AAD 1566) As a New Anthelmintic Drug Development Candidate. *Parasitol Res* **103**:931-939.
- Karlin A, Cox R N, DiPaola M, Holtzman E, Kao P N, Lobel P, Wang L and Yodh N (1986) Functional Domains of the Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Ann N Y Acad Sci* **463**:53-69.
- Kelley SP, Dunlop J I, Kirkness E F, Lambert J J and Peters J A (2003) A Cytoplasmic Region Determines Single-Channel Conductance in 5-HT₃ Receptors. *Nature* **424**:321-324.
- Kistler J and Stroud R M (1981) Crystalline Arrays of Membrane-Bound Acetylcholine Receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**:3678-3682.
- Lape R, Colquhoun D and Sivilotti L G (2008) On the Nature of Partial Agonism in the Nicotinic Receptor Superfamily. *Nature* **454**:722-727.
- Law RJ, Henchman R H and McCammon J A (2005) A Gating Mechanism Proposed From a Simulation of a Human Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:6813-6818.
- Le Novere N. and Changeux J P (2001) LGICdb: the Ligand-Gated Ion Channel Database. *Nucleic Acids Res* **29**:294-295.

- Le Novère N., Corringer P J and Changeux J P (2002) The Diversity of Subunit Composition in NACHRs: Evolutionary Origins, Physiologic and Pharmacologic Consequences. *J Neurobiol* **53**:447-456.
- Lee WY, Free C R and Sine S M (2008) Nicotinic Receptor Interloop Proline Anchors Beta1-Beta2 and Cys Loops in Coupling Agonist Binding to Channel Gating. *J Gen Physiol* **132**:265-278.
- Lee WY, Free C R and Sine S M (2009) Binding to Gating Transduction in Nicotinic Receptors: Cys-Loop Energetically Couples to Pre-M1 and M2-M3 Regions. *J Neurosci* **29**:3189-3199.
- Lee WY and Sine S M (2005) Principal Pathway Coupling Agonist Binding to Channel Gating in Nicotinic Receptors. *Nature* **438**:243-247.
- Lester HA, Dibas M I, Dahan D S, Leite J F and Dougherty D A (2004) Cys-Loop Receptors: New Twists and Turns. *Trends Neurosci* **27**:329-336.
- Levandoski MM, Piket B and Chang J (2003) The Anthelmintic Levamisole Is an Allosteric Modulator of Human Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Eur J Pharmacol* **471**:9-20.
- Liu QS and Berg D K (1999) Extracellular Calcium Regulates Responses of Both Alpha3- and Alpha7-Containing Nicotinic Receptors on Chick Ciliary Ganglion Neurons. *J Neurophysiol* **82**:1124-1132.
- Liu X, Xu Y, Li H, Wang X, Jiang H and Barrantes F J (2008) Mechanics of Channel Gating of the Nicotinic Acetylcholine Receptor. *PLoS Comput Biol* **4**:e19.
- Lovell SC, Davis I W, Arendall W B, III, de Bakker P I, Word J M, Prisant M G, Richardson J S and Richardson D C (2003) Structure Validation by Calpha Geometry: Phi, Psi and Cbeta Deviation. *Proteins* **50**:437-450.
- Lukas RJ, Changeux J P, Le N N, Albuquerque E X, Balfour D J, Berg D K, Bertrand D, Chiappinelli V A, Clarke P B, Collins A C, Dani J A, Grady S R, Kellar K J, Lindstrom J M, Marks M J, Quik M, Taylor P W and Wonnacott S (1999) International Union of Pharmacology. XX. Current Status of the Nomenclature for Nicotinic Acetylcholine Receptors and Their Subunits. *Pharmacol Rev* **51**:397-401.
- Lumms SC, Beene D L, Lee L W, Lester H A, Broadhurst R W and Dougherty D A (2005) Cis-Trans Isomerization at a Proline Opens the Pore of a Neurotransmitter-Gated Ion Channel. *Nature* **438**:248-252.
- Macklin KD, Maus A D, Pereira E F, Albuquerque E X and Conti-Fine B M (1998) Human Vascular Endothelial Cells Express Functional Nicotinic Acetylcholine Receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **287**:435-439.
- Martin RJ (1996) An Electrophysiological Preparation of *Ascaris Suum* Pharyngeal Muscle Reveals a Glutamate-Gated Chloride Channel Sensitive to the Avermectin Analogue, Milbemycin D. *Parasitology* **112** (Pt 2):247-252.

- Martin RJ (1985) Gamma-Aminobutyric Acid- and Piperazine-Activated Single-Channel Currents From *Ascaris Suum* Body Muscle. *Br J Pharmacol* **84**:445-461.
- Martin RJ, Clark C L, Trailovic S M and Robertson A P (2004) Oxantel Is an N-Type (Methyridine and Nicotine) Agonist Not an L-Type (Levamisole and Pyrantel) Agonist: Classification of Cholinergic Anthelmintics in *Ascaris*. *Int J Parasitol* **34**:1083-1090.
- Martin RJ and Robertson A P (2007) Mode of Action of Levamisole and Pyrantel, Anthelmintic Resistance, E153 and Q57. *Parasitology* **134**:1093-1104.
- Martin RJ, Robertson A P and Bjorn H (1997) Target Sites of Anthelmintics. *Parasitology* **114 Suppl**:S111-S124.
- Martin RJ, Valkanov M A, Dale V M, Robertson A P and Murray I (1996) Electrophysiology of *Ascaris* Muscle and Anti-Nematodal Drug Action. *Parasitology* **113 Suppl**:S137-S156.
- Matsuda K, Shimomura M, Ihara M, Akamatsu M and Sattelle D B (2005) Neonicotinoids Show Selective and Diverse Actions on Their Nicotinic Receptor Targets: Electrophysiology, Molecular Biology, and Receptor Modeling Studies. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**:1442-1452.
- Matsuda K, Shimomura M, Kondo Y, Ihara M, Hashigami K, Yoshida N, Raymond V, Mongan N P, Freeman J C, Komai K and Sattelle D B (2000) Role of Loop D of the Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor in Its Interaction With the Insecticide Imidacloprid and Related Neonicotinoids. *Br J Pharmacol* **130**:981-986.
- Maus AD, Pereira E F, Karachunski P I, Horton R M, Navaneetham D, Macklin K, Cortes W S, Albuquerque E X and Conti-Fine B M (1998) Human and Rodent Bronchial Epithelial Cells Express Functional Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Mol Pharmacol* **54**:779-788.
- Melis C, Bussi G, Lummis S C and Molteni C (2009) Trans-Cis Switching Mechanisms in Proline Analogues and Their Relevance for the Gating of the 5-HT₃ Receptor. *J Phys Chem B* **113**:12148-12153.
- Mike A, Castro N G and Albuquerque E X (2000) Choline and Acetylcholine Have Similar Kinetic Properties of Activation and Desensitization on the Alpha7 Nicotinic Receptors in Rat Hippocampal Neurons. *Brain Res* **882**:155-168.
- Miyazawa A, Fujiyoshi Y and Unwin N (2003) Structure and Gating Mechanism of the Acetylcholine Receptor Pore. *Nature* **423**:949-955.
- Neher E and Steinbach J H (1978) Local Anaesthetics Transiently Block Currents Through Single Acetylcholine-Receptor Channels. *J Physiol* **277**:153-176.
- Paulsen IM, Martin I L and Dunn S M (2009) Isomerization of the Proline in the M2-M3 Linker Is Not Required for Activation of the Human 5-HT_{3A} Receptor. *J Neurochem* **110**:870-878.
- Plazas PV, Katz E, Gomez-Casati M E, Bouzat C and Elgoyhen A B (2005) Stoichiometry of the Alpha9alpha10 Nicotinic Cholinergic Receptor. *J Neurosci* **25**:10905-10912.

- Price KL, Bower K S, Thompson A J, Lester H A, Dougherty D A and Lummis S C (2008) A Hydrogen Bond in Loop A Is Critical for the Binding and Function of the 5-HT₃ Receptor. *Biochemistry* **47**:6370-6377.
- Putrenko I, Zakikhani M and Dent J A (2005) A Family of Acetylcholine-Gated Chloride Channel Subunits in *Caenorhabditis Elegans*. *J Biol Chem* **280**:6392-6398.
- Qin F, Auerbach A and Sachs F (1996) Estimating Single-Channel Kinetic Parameters From Idealized Patch-Clamp Data Containing Missed Events. *Biophys J* **70**:264-280.
- Rayes D, De Rosa M J, Bartos M and Bouzat C (2004) Molecular Basis of the Differential Sensitivity of Nematode and Mammalian Muscle to the Anthelmintic Agent Levamisole. *J Biol Chem* **279**:36372-36381.
- Rayes D, De Rosa M J, Sine S M and Bouzat C (2009) Number and Locations of Agonist Binding Sites Required to Activate Homomeric Cys-Loop Receptors. *J Neurosci* **29**:6022-6032.
- Rayes D, De Rosa M J, Spitzmaul G and Bouzat C (2001) The Anthelmintic Pyrantel Acts As a Low Efficacious Agonist and an Open-Channel Blocker of Mammalian Acetylcholine Receptors. *Neuropharmacology* **41**:238-245.
- Rayes D, Spitzmaul G, Sine S M and Bouzat C (2005) Single-Channel Kinetic Analysis of Chimeric Alpha7-5HT_{3A} Receptors. *Mol Pharmacol* **68**:1475-1483.
- Redman CA, Robertson A, Fallon P G, Modha J, Kusel J R, Doenhoff M J and Martin R J (1996) Praziquantel: an Urgent and Exciting Challenge. *Parasitol Today* **12**:14-20.
- Ringstad N, Abe N and Horvitz H R (2009) Ligand-Gated Chloride Channels Are Receptors for Biogenic Amines in *C. Elegans*. *Science* **325**:96-100.
- Robertson SJ and Martin R J (1993) Levamisole-Activated Single-Channel Currents From Muscle of the Nematode Parasite *Ascaris Suum*. *Br J Pharmacol* **108**:170-178.
- Rucktooa P, Smit A B and Sixma T K (2009) Insight in NACHR Subtype Selectivity From AChBP Crystal Structures. *Biochem Pharmacol* **78**:777-787.
- Rufener L, Maser P, Roditi I and Kaminsky R (2009) *Haemonchus Contortus* Acetylcholine Receptors of the DEG-3 Subfamily and Their Role in Sensitivity to Monepantel. *PLoS Pathog* **5**:e1000380.
- Sali A and Blundell T L (1993) Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. *J Mol Biol* **234**:779-815.
- Shi J, Blundell T L and Mizuguchi K (2001) FUGUE: Sequence-Structure Homology Recognition Using Environment-Specific Substitution Tables and Structure-Dependent Gap Penalties. *J Mol Biol* **310**:243-257.
- Shimomura M, Okuda H, Matsuda K, Komai K, Akamatsu M and Sattelle D B (2002) Effects of Mutations of a Glutamine Residue in Loop D of the Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor on Agonist Profiles for Neonicotinoid Insecticides and Related Ligands. *Br J Pharmacol* **137**:162-169.

Sigworth FJ and Sine S M (1987) Data Transformations for Improved Display and Fitting of Single-Channel Dwell Time Histograms. *Biophys J* **52**:1047-1054.

Sine SM (1993) Molecular Dissection of Subunit Interfaces in the Acetylcholine Receptor: Identification of Residues That Determine Curare Selectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:9436-9440.

Sine SM (2002) The Nicotinic Receptor Ligand Binding Domain. *J Neurobiol* **53**:431-446.

Sine SM, Claudio T and Sigworth F J (1990) Activation of Torpedo Acetylcholine Receptors Expressed in Mouse Fibroblasts. Single Channel Current Kinetics Reveal Distinct Agonist Binding Affinities. *J Gen Physiol* **96**:395-437.

Sine SM and Engel A G (2006) Recent Advances in Cys-Loop Receptor Structure and Function. *Nature* **440**:448-455.

Steinbach JH and Chen Q (1995) Antagonist and Partial Agonist Actions of D-Tubocurarine at Mammalian Muscle Acetylcholine Receptors. *J Neurosci* **15**:230-240.

Swope SL, Qu Z and Haganir R L (1995) Phosphorylation of the Nicotinic Acetylcholine Receptor by Protein Tyrosine Kinases. *Ann N Y Acad Sci* **757**:197-214.

Taly A, Corringer P J, Guedin D, Lestage P and Changeux J P (2009) Nicotinic Receptors: Allosteric Transitions and Therapeutic Targets in the Nervous System. *Nat Rev Drug Discov* **8**:733-750.

Taylor P, Talley T T, Radic' Z, Hansen S B, Hibbs R E and Shi J (2007) Structure-Guided Drug Design: Conferring Selectivity Among Neuronal Nicotinic Receptor and Acetylcholine-Binding Protein Subtypes. *Biochem Pharmacol* **74**:1164-1171.

Tsetlin V and Hucho F (2009) Nicotinic Acetylcholine Receptors at Atomic Resolution. *Curr Opin Pharmacol* **9**:306-310.

Ulens C, Akdemir A, Jongejan A, van E R, Bertrand S, Perrakis A, Leurs R, Smit A B, Sixma T K, Bertrand D and de E, I (2009) Use of Acetylcholine Binding Protein in the Search for Novel Alpha7 Nicotinic Receptor Ligands. In Silico Docking, Pharmacological Screening, and X-Ray Analysis. *J Med Chem* **52**:2372-2383.

Ulens C, Hogg R C, Celie P H, Bertrand D, Tsetlin V, Smit A B and Sixma T K (2006) Structural Determinants of Selective Alpha-Conotoxin Binding to a Nicotinic Acetylcholine Receptor Homolog AChBP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:3615-3620.

Unwin N (2005) Refined Structure of the Nicotinic Acetylcholine Receptor at 4A Resolution. *J Mol Biol* **346**:967-989.

Valera S, Ballivet M and Bertrand D (1992) Progesterone Modulates a Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:9949-9953.

Vassilatis DK, Elliston K O, Paress P S, Hamelin M, Arena J P, Schaeffer J M, Van der Ploeg L H and Cully D F (1997) Evolutionary Relationship of the Ligand-Gated Ion Channels and the Avermectin-Sensitive, Glutamate-Gated Chloride Channels. *J Mol Evol* **44**:501-508.

- Villarroel A and Sakmann B (1992) Threonine in the Selectivity Filter of the Acetylcholine Receptor Channel. *Biophys J* **62**:196-205.
- Wang HL, Auerbach A, Bren N, Ohno K, Engel A G and Sine S M (1997) Mutation in the M1 Domain of the Acetylcholine Receptor Alpha Subunit Decreases the Rate of Agonist Dissociation. *J Gen Physiol* **109**:757-766.
- Wang HL, Cheng X, Taylor P, McCammon J A and Sine S M (2008) Control of Cation Permeation Through the Nicotinic Receptor Channel. *PLoS Comput Biol* **4**:e41.
- Wang HL, Toghraee R, Papke D, Cheng X L, McCammon J A, Ravaioli U and Sine S M (2009) Single-Channel Current Through Nicotinic Receptor Produced by Closure of Binding Site C-Loop. *Biophys J* **96**:3582-3590.
- Wang K, Hackett J T, Cox M E, Van H M, Lindstrom J M and Parsons S J (2004) Regulation of the Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor by SRC Family Tyrosine Kinases. *J Biol Chem* **279**:8779-8786.
- Wells GB (2008) Structural Answers and Persistent Questions About How Nicotinic Receptors Work. *Front Biosci* **13**:5479-5510.
- Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, Unger R and Kirkpatrick C J (2003) The Non-Neuronal Cholinergic System in Humans: Expression, Function and Pathophysiology. *Life Sci* **72**:2055-2061.
- Willcockson IU, Hong A, Whisenant R P, Edwards J B, Wang H, Sarkar H K and Pedersen S E (2002) Orientation of D-Tubocurarine in the Muscle Nicotinic Acetylcholine Receptor-Binding Site. *J Biol Chem* **277**:42249-42258.
- Williams ME, Burton B, Urrutia A, Shcherbatko A, Chavez-Noriega L E, Cohen C J and Aiyar J (2005) Ric-3 Promotes Functional Expression of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Alpha7 Subunit in Mammalian Cells. *J Biol Chem* **280**:1257-1263.
- Williamson SM, Robertson A P, Brown L, Williams T, Woods D J, Martin R J, Sattelle D B and Wolstenholme A J (2009) The Nicotinic Acetylcholine Receptors of the Parasitic Nematode *Ascaris Suum*: Formation of Two Distinct Drug Targets by Varying the Relative Expression Levels of Two Subunits. *PLoS Pathog* **5**:e1000517.
- Wolstenholme AJ and Rogers A T (2005) Glutamate-Gated Chloride Channels and the Mode of Action of the Avermectin/Milbemycin Anthelmintics. *Parasitology* **131 Suppl**:S85-S95.
- Wu TY, Smith C M, Sine S M and Levandoski M M (2008) Morantel Allosterically Enhances Channel Gating of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Alpha 3 Beta 2 Receptors. *Mol Pharmacol* **74**:466-475.
- Xiu X, Hanek A P, Wang J, Lester H A and Dougherty D A (2005) A Unified View of the Role of Electrostatic Interactions in Modulating the Gating of Cys Loop Receptors. *J Biol Chem* **280**:41655-41666.
- Xiu X, Puskar N L, Shanata J A, Lester H A and Dougherty D A (2009) Nicotine Binding to Brain Receptors Requires a Strong Cation-Pi Interaction. *Nature* **458**:534-537.

Zhang ZW, Coggan J S and Berg D K (1996) Synaptic Currents Generated by Neuronal Acetylcholine Receptors Sensitive to Alpha-Bungarotoxin. *Neuron* **17**:1231-1240.

Zheng Y, Hirschberg B, Yuan J, Wang A P, Hunt D C, Ludmerer S W, Schmatz D M and Cully D F (2002) Identification of Two Novel *Drosophila Melanogaster* Histamine-Gated Chloride Channel Subunits Expressed in the Eye. *J Biol Chem* **277**:2000-2005.

Zhong W, Gallivan J P, Zhang Y, Li L, Lester H A and Dougherty D A (1998) From Ab Initio Quantum Mechanics to Molecular Neurobiology: a Cation-Pi Binding Site in the Nicotinic Receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:12088-12093.

Zhu BT (2005) Mechanistic Explanation for the Unique Pharmacologic Properties of Receptor Partial Agonists. *Biomed Pharmacother* **59**:76-89.

Zouridakis M, Zisimopoulou P, Poulas K and Tzartos S J (2009) Recent Advances in Understanding the Structure of Nicotinic Acetylcholine Receptors. *IUBMB Life* **61**:407-423.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

α : velocidad de cierre del canal

α -Btx: α -bungarotoxina

$\alpha 7$ -5HT_{3A}: receptor quimérico formado por secuencias de $\alpha 7$ en el dominio extracelular y serotonina (5-HT_{3A}) en el transmembrana

β : velocidad de apertura del canal

$\beta 10$: extremo de la hoja plegada $\beta 10$

θ : constante de gatillado del canal

$\tau_{\text{crít}}$: tiempo crítico

$\tau_{\text{recuperación}}$: tiempo de recuperación

τ_0 : tiempo de estado abierto

°C: grados centígrados

μM : micromolar

μs : microsegundos

5-HT: serotonina (5-hidroxitriptamina)

5-HT_{3A}R: receptor de serotonina tipo 3A

A: agonista

A1: estado abierto breve

A2: estado abierto largo

Å: angstrom

ACh: acetilcolina

AChBP: proteína unidora de acetilcolina

AChR: receptor de acetilcolina

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazolpropiónico

ATP: adenosín trifosfato

B: estado bloqueado

BOSC 23: células embrionarias de riñón humano modificadas

C: estado cerrado

C1: estado cerrado breve

C2: estado cerrado largo

Ca²⁺: catión calcio

Cys-loop: segmento que conecta las hojas plegadas $\beta 6$ y $\beta 7$ ubicado en la interfase entre los dominios extracelular y transmembrana.

D: estado desensibilizado

DS: desvío estándar

EC₅₀: dosis efectiva 50

ECD: dominio extracelular

ECS: solución extracelular

ELIC: bacteria *Erwinia chrysanthemi*

Fig: figura

GABA: ácido γ -aminobutírico

GFP: proteína verde fluorescente

GLIC: bacteria *Gloebacter violaceus*

GlyR: receptor de glicina

I: corriente

ICD: dominio intracelular

ICS: solución intracelular

K: constante de disociación

K⁺: catión potasio

k_{+b}: velocidad de bloqueo

k_{-b}: velocidad de desbloqueo

K_B: constante de disociación para el bloqueo

kHz: kilohertz

LGIC: canales iónicos activados por ligandos

log: logaritmo

Loop $\beta 1\beta 2$: segmento que conecta las hojas plegadas $\beta 1$ y $\beta 2$ ubicado en la interfase entre los dominios extracelular y transmembrana.

Loop $\beta 8\beta 9$: segmento que conecta las hojas plegadas $\beta 8$ y $\beta 9$ ubicado en la interfase entre los dominios extracelular y transmembrana.

M: molar (concentración)

M1: primer segmento transmembranal

M2: segundo segmento transmembranal

M3: tercer segmento transmembranal

M4: cuarto segmento transmembranal
M2M3: porción que conecta los segmentos transmembrana M2 y M3
mM: milimolar
ms: milisegundos
mV: milivoltio
Na⁺: catión sodio
nH: coeficiente de Hill
NMDA: *N*-metil-D-aspartato
pA: picoampere
P_{apertura}: probabilidad de apertura
PDB: base de datos de proteínas
post-M4: extremo terminal del segmento M4
pre-M1: principio del segmento M1
R*: receptor en estado activo
R: receptor en estado de reposo
Receptor 5-HT_{3A}: receptor de serotonina tipo 3
Receptores P2X: receptores gatillados por ATP
REFER: *Rate-Equilibrium Free Energy Relationship*
Ric-3: chaperona Resistente a la Inhibición por Colinesterasa.
s: segundos
 τ_d : constante de tiempo de caída debida a desensibilización
TMD: dominio transmembrana
V: voltaje

PUBLICACIONES

PUBLICACIONES

Parte de los resultados presentados en esta Tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones:

- Bartos M, Corradi J, and Bouzat C (2009) Structural Basis of Activation of Cys-loop Receptors. *Molecular Neurobiology* **40**(3):236-252.
- Bartos M, Price KL, Lummis S, and Bouzat C (2009) Glutamine 57 at the complementary binding-site face is a key determinant of morantel selectivity for $\alpha 7$ nicotinic receptors. *Journal of Biological Chemistry* **284**(32):21478-21487.
- Bouzat C, Bartos M, Corradi J, and Sine SM (2008) The Interface between Extracellular and Transmembrane Domains of Homomeric Cys-Loop Receptors Governs Open-Channel Lifetime and Rate of Desensitization. *The Journal of Neuroscience* **28**(31):7808-7819.
- Bartos M, Rayes D, and Bouzat C (2006) Molecular Determinants of Pyrantel Selectivity in Nicotinic Receptors. *Molecular Pharmacology* **70**(4):1307-1318.
- Rayes D, De Rosa MJ, Bartos M, and Bouzat C (2004) Molecular basis of the differential sensitivity of nematode and mammalian muscle to the anthelmintic agent levamisole. *Journal of Biological Chemistry* **279**(35):36372-36381.

