

El receptor nicotínico de acetilcolina: estudios sobre el reconocimiento y ensamblaje de subunidades

M. Criado^a, M. García-Guzmán^a, F. Sala^b, S. Sala^c y A. Campos-Caro^a

Departamento de ^aNeuroquímica, ^bFarmacología y ^cFisiología.
Instituto de Neurociencias. Universidad de Alicante.

Introducción

Los receptores asociados a canales iónicos constituyen una clase de proteínas de membrana esenciales en la transducción rápida de señales¹. La propiedad que mejor define a este tipo de receptores es que el neurotransmisor controla la apertura del canal al unirse a un sitio del receptor. La estructura que caracteriza los receptores asociados a canales iónicos es la de un oligómero que forma un poro a través de la membrana (fig. 1). Existen diversos tipos de receptores, según el neurotransmisor que los activa: acetilcolina (tipo nicotínico), ácido γ -aminobutírico (GABA_A), glicocola, serotonina (5-HT₃) y glutamato (tipos NMDA y noNMDA^{2,3}).

Gran parte de la información estructural y funcional que se posee sobre estos receptores se ha obtenido a partir del receptor nicotínico de acetilcolina (AChR) presente en la unión neuromuscular y en el órgano eléctrico de algunos peces⁴. El AChR del músculo esquelético está constituido por 5 subunidades que atraviesan la membrana, denominadas α , β , y δ en una estequiometría $\alpha_2\beta\gamma\delta$. El AChR de tipo neuronal es también un pentámero pero formado de otras subunidades (subunidades con sitio de unión de agonistas $\alpha_2-\alpha_6$ y subunidades estructurales $\beta_2-\beta_4$)⁵. En cada subunidad se han detectado hasta 4 fragmentos hidrofóbicos que, plegados en forma de α -hélice, podrían atravesar la membrana (fig. 1). Aunque existen, al menos, 15 subunidades distintas, todas ellas poseen una estructura primaria homóloga y una organización estructural similar: un dominio extracelular que comprende la zona aminoterminal de cada subunidad, tres fragmentos transmembranales, una zona citoplásmica y un cuarto fragmento transmembranal con un corto segmento carboxilo-terminal (fig. 1). Dentro de cada una de las áreas señaladas existen otros elementos a destacar:

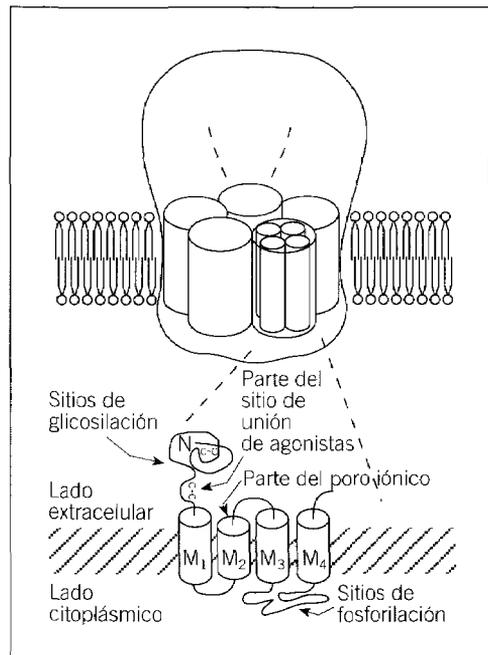


Fig. 1. Representación esquemática de la estructura de un receptor ionotrópico. En la parte superior de la figura puede observarse la organización estructural de un monómero de receptor formado por 5 subunidades. Todas las subunidades contribuyen de forma equivalente a la formación del monómero. Se cree que la sección más angosta del canal está formada por los fragmentos transmembranales de cada subunidad, que en la ilustración se indican como cilindros estrechos incluidos dentro de cilindros más anchos, que representan cada subunidad. En la parte inferior se resumen las principales características estructurales de cada subunidad, haciendo especial referencia a la subunidad α , que es la que contiene el sitio de unión de agonistas y a los fragmentos transmembranales M_1-M_4 .

1) en el dominio extracelular un par de cisteínas separadas por 15 residuos, que forman un puente disulfuro, y que se consideran un signo estructural típico de los receptores ionotrópicos. También se ha localizado en la zona extracelular el sitio de unión de agonistas; 2) dentro de los segmentos transmembranales, el segundo de ellos, que es el más polar, parece estar directamente implicado en la formación del poro iónico. A la entrada del mismo hay aminoácidos cargados negativamente, y 3) en la zona citoplásmica, la más variable entre las distintas subunidades, existen sitios de fosforilación específicos para diversas cinasas⁶.

Dado el gran número de subunidades que se han caracterizado hasta el momento, las posibles combinaciones que pueden obtenerse son muy numerosas. Averiguar cuáles son las combinaciones que producen receptores *in vivo* y qué mecanismos determinan la formación de determinadas combinaciones, su función y su localización son retos que la investigación sobre receptores ionotrópicos tiene planteados en la actualidad.

Modelo experimental

Las subunidades del receptor nicotínico neuronal denominadas α_3 y α_7 se expresan en la célula cromafín de la médula adrenal, formando parte, cada una de ellas, de un diferente subtipo de receptor. Esto implica que cada subunidad debe poseer dominios de reconocimiento específico que determinen qué subtipo de receptor han de formar. De hecho, estas subunidades, que han sido clonadas y secuenciadas en nuestro laboratorio^{7,8}, tienen distintos requerimientos de ensamblaje al ser expresadas en sistemas heterólogos, como es el oocito de *Xenopus*. Así pues, mientras que la subunidad α_3 necesita ensamblarse con subunidades estructurales para producir un receptor funcional, la subunidad α_7 es capaz, por sí sola, de producir receptores homoméricos. Hemos aprovechado este comportamiento diferente, que puede ser el reflejo de la existencia de esos dominios de reconocimiento que anteriormente se mencionaban, para diseñar un sistema modelo que permita abordar el estudio de los mismos. Dicho sistema consistió en la construcción de subunidades quiméricas α_3/α_7 y su posterior expresión en oocitos, examinando su capacidad de generar receptores homoméricos. El ensamblaje de homómeros funcionales se siguió midiendo la fijación de α -bungarotoxina (α -Bgt) a la membrana externa de los oocitos y las corrientes

producidas al activar los receptores con nicotina. De esta forma, sería posible detectar receptores adecuadamente ensamblados que han seguido un proceso de maduración correcto desde el retículo endoplásmico a la membrana plasmática. Por el contrario, las subunidades mal ensambladas serían retenidas intracelularmente y degradadas⁹.

Para la construcción de las quimeras α_3/α_7 se seleccionaron varios dominios estructurales (véase esquema de la subunidad α_7 en la fig. 2) que se describen a continuación. El primer dominio (dominio 0) estaba constituido por el péptido señal de la subunidad α_7 y una pequeña zona de la región 5' no codificante de la misma subunidad. Todas las quimeras contienen dicho dominio, de forma que un posible efecto en la expresión debido al mismo sería idéntico para todas ellas y no afectaría el resultado final. Esta precaución fue tomada debido a que en otros casos se ha observado que la región 5' no codificante y/o el péptido señal pueden influir en los niveles de expresión. El dominio 1 comprendía los primeros 126 aminoácidos de cada subunidad, llegando justo hasta un puente disulfuro, sin incluirlo, que está presente en todas las subunidades de todos los receptores ionotrópicos caracterizados hasta el momento. El dominio 2 se extendía desde este puente disulfuro hasta el aminoácido 205, justo antes del primer segmento transmembranal M_1 . El dominio 3 comprendía el segmento M_1 y la pequeña zona hidrofílica que lo conecta al segmento M_2 . Por último, la región del carboxilo terminal, incluyendo la zona citoplásmica variable y el fragmento hidrofóbico M_4 , constituyó el dominio 4 (fig. 2).

Resultados

Previamente otros grupos han demostrado que la región N-terminal hidrofílica de los receptores ionotrópicos es responsable del reconocimiento entre subunidades^{10,11} y de la formación de homómeros¹². Por tanto, comenzamos nuestro análisis con una quimera que era totalmente α_3 , excepto por el dominio 0 de α_7 , y posteriormente incluimos gradualmente en la misma los dominios correspondientes a la subunidad α_7 . Como era de esperar, la subunidad α_3 por sí sola era incapaz de producir receptores homoméricos (fig. 2, construcción C1), mientras que la subunidad α_7 sí que producía receptores capaces de unir α -Bgt y activarse al añadirles nicotina. Como puede observarse en la figura 2, los valores obtenidos con la subunidad α_7 son considerados como referencia para

todos los demás. La inclusión del dominio 1 no supuso una mejora en la expresión (fig. 2, construcción C2). Hay que indicar que el sitio de fijación de α -Bgt se ha localizado en el dominio 2 de la subunidad α_7 , y al tener las quimeras C1 y C2 el dominio correspondiente de la subunidad α_3 , que no tiene capacidad de unir la toxina, se esperaba que estas quimeras, incluso formando un receptor funcional, fueran incapaces de presentar fijación de α -Bgt, como así sucedió. Sin embargo, en caso de expresar un receptor funcional deberían producir corrientes, y esto tampoco ocurrió. Al extender al dominio 2 la secuencia de la subunidad α_7 (fig. 2, construcción C3) se pudieron detectar receptores, tanto de fijación de α -Bgt como de corrientes activadas por ligandos colinérgicos. No obstante, el nivel de expresión de receptores funcionales era bajo, lo que indica que hacían falta otros dominios para obtener un ensamblaje óptimo. Dado que la zona correspondiente a los fragmentos transmembranales está bastante conservada entre las distintas subunidades, se consideró la posibilidad de que los dominios necesarios podrían estar en la zona del carboxilo terminal, que como ya se ha indicado, es la más variable entre subunidades. Sin embargo, al incluir en la correspondiente quimera el dominio 4 de la subunidad α_7 (fig. 2, construcción C4) no se obtuvo mayor nivel de expresión. Este resultado nos indujo a analizar la zona correspondiente a los segmentos transmembranales, y comenzamos añadiendo el primer segmento M_1 (dominio 3, fig 2, construcción C5). La expresión de receptores se incrementó espectacularmente, por encima incluso de la obtenida con la subunidad α_7 . Esta subunidad quimérica resultó muy interesante, ya que si bien era capaz de generar receptores que unían α -Bgt, estos no producían corrientes al activar con nicotina. El hecho de que esta quimera posea el fragmento M_1 de la subunidad α_7 y el M_2 , considerado formador del poro, de la subunidad α_3 , puede ser que provoque de alguna forma la interrupción de la necesaria comunicación entre el sitio de fijación de agonistas y el mecanismo de apertura del canal. Por tanto, podía concluirse que el segmento hidrofóbico M_1 era indispensable para el ensamblaje de homómeros. Sin embargo, y dada la estrategia de selección de las quimeras que se utilizó, quedaba por contestar la siguiente pregunta: ¿ya que se ha comprobado que los dominios 1 y 2 no son suficientes para producir la homooligomerización, son estos, al menos, necesarios para la misma? o, en otras palabras, ¿es suficiente el fragmento

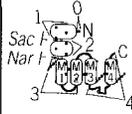
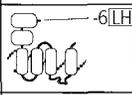
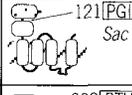
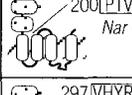
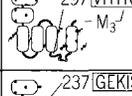
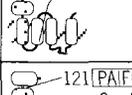
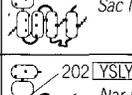
Quimera	Estructura	Fijación de α -Bgt (%)	Corriente (%)
α_7		100 ± 10	100 ± 17
C1		1,2 ± 0,2	0
C2		2,7 ± 0,6	0
C3		13,4 ± 1,7	5,1 ± 1,6
C4		11,0 ± 0,8	3,3 ± 1,1
C5		200 ± 17	0
C6		3,2 ± 0,8	0
C7		2,3 ± 0,3	88,3 ± 15,1

Fig. 2. Estructuras de las quimeras α_3/α_7 construidas y resultados obtenidos con las mismas. En cada línea se indica el nombre de la correspondiente quimera, la estructura de la misma y los datos de fijación de α -Bgt y de corrientes iónicas obtenidos cuando el ARN correspondiente a cada subunidad se inyectó en oocitos de *Xenopus*. La primera construcción es la subunidad α_7 , que incluye los dominios estructurales (numerados 0 a 4) seleccionados para construir las diferentes quimeras y dos sitios de restricción (SacI y NarI) utilizados en dicha construcción. En cada quimera se indican sombreados los dominios correspondientes a la subunidad α_7 , mientras que en blanco están los correspondientes a la subunidad α_3 . También se indica a la derecha del esquema de cada construcción la secuencia de aminoácidos de la zona correspondiente a la unión α_3/α_7 de cada quimera, así como algunas características de la misma, que pueden ser de utilidad para facilitar su localización. También en este caso los aminoácidos sombreados pertenecen a la subunidad α_7 y los señalados en blanco a la α_3 . La construcción de las quimeras se llevó a cabo aprovechando los sitios de restricción señalados que eran comunes a las dos subunidades (SacI) o se introdujeron por mutagénesis (NarI), y también por métodos publicados¹⁴.

M₁ para dirigir la formación de receptores homoméricos? Para ello construimos las quimeras C6 y C7, partiendo de la subunidad α_7 , y sustituyendo dominios 1 y 2 por los correspondientes de la subunidad α_3 . Al sustituir el dominio 1 de la subunidad α_7 por el correspondiente de la subunidad α_3 (fig. 2, construcción C6) se observó que no había ensamblaje de receptores funcionales y, por tanto, este dominio era imprescindible. Por el contrario, el dominio 2 no parecía tan importante, porque al sustituirlo en la subunidad α_7 por su equivalente de la subunidad α_3 (fig. 2, construcción C7), se seguían expresando altos niveles de receptores funcionales, que se activaban por agonistas. Como se ha indicado anteriormente, sólo el dominio 2 de la subunidad α_7 contiene el sitio de unión de α -Bgt, y esta quimera poseía el correspondiente de la subunidad α_3 , por lo que era de esperar que no fuera capaz de unir la toxina, como sucedió.

Conclusión

La expresión en una célula individual de diferentes subtipos de neuroreceptores formados por subunidades diferentes pero homólogas exige la existencia de mecanismos capaces de controlar la identificación y la interacción específicas de las subunidades que conformarán las distintas especies moleculares. Como abordaje inicial hacia la determinación de la contribución de los dominios específicos de reconocimiento entre subunidades hemos estudiado el comportamiento de proteínas quiméricas compuestas de subunidades que se caracterizan por requerimientos de ensamblaje diferentes. Nuestros resultados indican que existen dos dominios importantes en el reconocimiento de subunidades. El primero es la zona aminoterminal, cuya importancia ya había sido destacada por otros investigadores¹⁰⁻¹². El otro dominio es el primer fragmento transmembranaral, que hemos reconocido por primera vez como imprescindible. ¿Es posible postular una interacción alostérica entre estos dos dominios? El plegamiento de la cadena peptídica comienza en cuanto el dominio aminoterminal emerge de la bicapa lipídica una vez atravesada la membrana del retículo endoplásmico. El plegamiento inicial del dominio 1 podría conducir al plegamiento cooperativo del dominio 3, estableciéndose así un mecanismo de ensamblaje adecuado para producir la asociación homomérica. Este sistema de reconocimiento podría ser más general y trascender más allá de los receptores ionotrópicos. Recien-

temente se ha demostrado que el primer fragmento transmembranaral de los canales de potasio dependientes de voltaje es esencial en procesos de ensamblaje de canales funcionales en asociación alostérica con un dominio aminoterminal¹³.

Agradecimiento

Este trabajo ha sido posible gracias al apoyo del Ministerio de Educación y Ciencia (DGICYT, proyectos PM89-0020 y PB92-0346) y de la Comisión de la Comunidad Económica Europea (proyecto SC1*CT91-0666). M. García-Guzmán fue becario predoctoral del Ministerio de Educación y Ciencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jessel TM, Kandell ER. Synaptic transmission: a bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication. *Cell* 1993; 72: 1-30.
2. Barnard EA. Receptor classes and the transmitter-gated ion channels. *Trends Biochem Sci* 1992; 17: 368-374.
3. Cockcroft VB, Osguthorpe DJ, Barnard EA, Friday AE, Lunt GG. Ligand-gated ion channels. Homology and diversity. *Mol Neurobiol* 1992; 4: 129-169.
4. Changeux JP, Galzi JL, Devillers-Thierry A, Bertrand D. The functional architecture of the acetylcholine nicotinic receptor explored by affinity labeling and site directed mutagenesis. *Quart Rev Biophys* 1992; 25: 395-432.
5. Sargent PB. The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu Rev Neurosci* 1993; 16: 403-443.
6. Betz H. Homology and analogy in transmembrane channel design: lessons from synaptic membrane proteins. *Biochemistry* 1990; 29: 3.591-3.599.
7. Criado M, Alamo L, Navarro A. Primary structure of an agonist bindings subunit of the nicotinic acetylcholine receptor from bovine adrenal chromaffin cells. *Neurochem Res* 1992; 17: 281-287.
8. García-Guzmán M, Sala F, Sala S, Campos-Caro A, Stühmer W, Gutiérrez LM et al. α -Bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors of bovine chromaffin cells: molecular cloning, functional expression and alternative splicing of the α_7 subunit. (enviado a publicación).
9. Herskowitz I. Inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* 1987; 329: 219-222.
10. Yu XM, Hall ZW. Extracellular domains mediating ϵ subunit interactions of muscle acetylcholine receptor. *Nature* 1991; 352: 64-67.

11. Verral S, Hall ZW. The N-terminal domains of acetylcholine receptor subunits contain recognition signals for the initial steps of receptor assembly. *Cell* 1992; 68: 23-31.
12. Kuhse J, Laube B, Magalaei D, Betz H. Assembly of the inhibitory glycine receptor: identification of amino acid sequence motifs governing subunit stoichiometry. *Neuron* 1993; 11: 1.049-1.056.
13. Babila T, Moscucci A, Wang H, Weaver FE, Koren G. Assembly of mammalian voltage-gated potassium channels: evidence for an important role of the first transmembrane segment. *Neuron* 1994; 12: 615-626.
14. Herlitz S, Koenen M. A general and rapid mutagenesis method using polymerase chain reaction. *Gene* 1990; 91: 143-147.

DISCUSIÓN

C. GONZÁLEZ: Querría preguntarle si en los cultivos de células cromafines bovinas ha observado alguna modificación en la densidad o en el número total de receptores y específicamente de los que ligan alfabungarotoxina, en tiempos sucesivos o en tiempos crecientes.

M. CRIADO: Esto no lo hemos estudiado, pero existen datos referidos a receptores neuronales que demuestran que si las células se cultivan en presencia de ligandos, ya sean agonistas o antagonistas, se produce una regulación que se da en unas tres veces más de sitios de unión de alfabungarotoxina.

P. SÁNCHEZ-GARCÍA: Clásicamente los farmacólogos hemos distinguido los receptores nicotínicos ganglionares, los receptores nicotínicos neuromusculares y los receptores nicotínicos en el sistema nervioso central. ¿Los nicotínicos ganglionares son idénticos a los receptores ubicados en el sistema nervioso central?

M. CRIADO: Actualmente se está comprobando que los distintos receptores nicotínicos difieren en sus subunidades componentes. Por ejemplo, en el sistema nervioso central, la composición más común es $\alpha_4\beta_2$, es decir, las unidades α_4 con las unidades β_2 forman un pentámero, son receptores presinápticos. En los receptores ganglionares del sistema nervioso periférico, por ejemplo de la célula cromafín, la composición de subunidades difiere. Estamos estudiando la célula cromafín, y hemos encontrado que no contiene unidades α_2 ni α_4 sino que es α_3 la subunidad que une agonistas y también hemos detectado la subunidad β_4 . Hay otra subunidad que es la subunidad α_5 , que no sabemos si también forma parte o no de estos receptores. Ello explica las diferencias de los receptores en cuanto a las propiedades electrofisiológicas, y también en cuanto a sensibilidad de agonistas.

C. MONTIEL: ¿Existen diferencias funcionales entre los receptores que fijan alfabungarotoxina y los que no la fijan?

M. CRIADO: Sí, existen también diferencias funcionales, por ejemplo, la capacidad de desensibilización es distinta. Los receptores α_7 , por ejemplo, se desensibilizan rápidamente y además al estudiar las secuencias desde el punto de vista evolutivo se observa que se desarrollaron divergencias bastante pronto durante la evolución.

J. MARSAL: Quisiera añadir alguna información complementaria a lo expuesto por el Dr. Criado. Usted se ha referido al hecho de inyectar mensajeros en el oocito y seguidamente comprobar su expresión en la membrana del mismo. También es posible inyectar membranas originales de, por ejemplo, un órgano eléctrico, y estas membranas se incorporan a la membrana del oocito, y lo hacen de manera funcional, es decir, que añadiendo acetilcolina dan unas corrientes que pueden llegar a 3 o 4 μA .

M. CRIADO: Es una información metodológica interesante.

A.G. GARCÍA: Querría hacer un comentario final, al hilo del título de esta mesa redonda, la farmacología de los canales iónicos. Aunque el receptor nicotínico del sistema nervioso central carece de una farmacología, de una farmacoterapia, se está trabajando activamente en ello. El problema de la adicción a la nicotina está despertando un interés inusitado, y creo que pronto podremos pensar en fármacos con aplicación terapéutica que actúen selectivamente en los receptores nicotínicos del sistema nervioso central, lo que probablemente se deba a estas estrategias de biología molecular que están identificando diferencias sutiles entre los receptores de la placa motora, del ganglio simpático y parasimpático y de la neurona.