



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

UNIVERSITAS

Interacciones lípido-proteína en el Receptor
Nicotínico de Acetilcolina: segregación de un
dominio lipídico inducido por la proteína

TESIS DOCTORAL

por

JOSE ANTONIO POVEDA LARROSA

Elche, 2002



CENTRO DE BIOLOGÍA
MOLECULAR Y CELULAR
Universidad Miguel Hernández (UMH)
Edificio Torregaitán. Campus de Elche
Avenida Estación s/n. E-03202
ELCHE (Alicante)· ESPAÑA - Spain

D. JOSÉ MANUEL GONZÁLEZ ROS, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández y director del Centro de Biología Molecular y Celular, y Dña. C. REYES MATEO MARTÍNEZ, Profesora Titular de la Universidad Miguel Hernández y miembro del Centro de Biología Molecular y Celular

CERTIFICAN: Que la Tesis Doctoral que lleva por título: “Interacciones lípido-proteína en el Receptor Nicotínico de Acetilcolina: segregación de un dominio lipídico inducido por la proteína”, presentada por D. José Antonio Poveda Larrosa para optar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Centro de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández.

Revisado el texto, estamos conformes con su presentación para ser juzgada,

Elche, a 14 de Enero de 2001.

Los Directores de la Tesis

José Manuel González Ros.

C.Reyes Mateo Martínez

*A mi familia y amigos,
por su apoyo durante
todo este tiempo*



Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a José Manuel González-Ros y a C. Reyes Mateo Martínez por su dedicación y acertada dirección en el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Con ello, me han dado la oportunidad de iniciar mi carrera investigadora.

También quisiera hacer especial mención a José Antonio Ferragut Rodríguez, ya que fue el primero en darme una oportunidad para trabajar en un laboratorio, así como a las personas que por entonces formaban su grupo, María Vicenta Camarasa Sabater y María Dolores Castro Galache, que tuvieron gran paciencia para enseñarme a trabajar en el laboratorio y con las que compartí tan gratos momentos.

Quisiera dar las gracias a mis compañeros de laboratorio, José Antonio Encinar Hidalgo, Asia Fernández Carvajal, José Heliodoro Villanueva Roig, María Luisa Molina Gallego y Francisco Nicolás Barrera. A José Antonio por su apoyo incondicional e inestimable ayuda en la realización de los experimentos de FT-IR y en todos los asuntos relacionados con la informática, así como en las discusiones sobre los resultados obtenidos. A Asia, por iniciarme en las técnicas de calorimetría y “stopped-flow” y ayudarme con todo tipo de protocolos relacionados con la purificación y procesado del AcChR. A José Heliodoro, por su apoyo y ayuda en los primeros pasos de mi andadura por el laboratorio. Finalmente, a María Luisa y Fran por su compañía en el laboratorio y sus contribuciones en algunos de los experimentos de la Tesis.

Asimismo, quisiera agradecer al Dr. Eurico Melo y José Pedro Santos Jorge del Instituto de Tecnología Química e Biológica de Oeiras, Portugal, por su colaboración en los experimentos de FRAP.

Finalmente, no me quiero olvidar de todo el personal, profesores, P.A.S. y becarios del C.B.M.C. por los buenos ratos que he pasado con ellos, tanto dentro como fuera del laboratorio.

FE DE ERRATAS

- En la figura 20 de la página 79, capítulo de *Resultados*, la leyenda que aparece dentro del gráfico está equivocada. Así, donde dice “+ AcChR” debería decir “- AcChR” y viceversa, tanto en el panel A como en el B.



ABREVIATURAS

α -Bgt: α -Bungarotoxina
AcChR: Receptor de acetilcolina
Asolectina: extractos lipídicos de semilla de soja
 β -DPH HPA: 2-(3-(difenilhexatrienil) propanoil)-1-hexadecanoil- *sn*-glicero-3-fosfocolina
 β -DPH HPC: 2-(3-(difenilhexatrienil) propanoil)-1-hexadecanoil- *sn*-glicero-3-fosfato
BSA: albúmina de suero bovino
CHAPS: 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
CD: dicroísmo circular
CM-Sephadex: carboximetil Sephadex
Col: colesterol
Colato: sal sódica del ácido 3 α , 7 α , 12 α -trihidroxi 5 β -colan-24-oico
DEAE-Sephadex: dietilaminoetil Sephadex
DHE: dehidroergosterol
DMPA: 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfato
DMPC: 1,2-dirimistoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina
DMPG: 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol
DMPS: 1,2 dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoserina
DPH: 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DSC: calorimetría diferencial de barrido
DTNB: ácido 5-5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico)
DTT: 1,4-ditiotreitól
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
EPR: resonancia paramagnética electrónica
FITC: isotiocianato de fluoresceína
FRAP: recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueo
FT-IR: espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier
Hepes: ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-etanosulfónico)
Laurdan: 6-dodecanoil-2-dimetilaminonaftaleno
LGIC: canales iónicos activados por ligando
PA: ácido fosfatídico
PAGE-SDS: electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
PC de huevo: fosfatidilcolina de yema de huevo
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PTSA: tetrasulfonato sódico de pireno
RET: transferencia de energía por resonancia
SDS: dodecilsulfato sódico.
TLC: cromatografía en capa fina
t-PnA: ácido transparinámico
Tris: tris (hidroximetil)-aminometano
Triton X-100: octil fenoxi polietoxietanol.

ÍNDICE



INTRODUCCIÓN

Descripción general del AcChR	1
Características estructurales del AcChR	5
Forma y dimensiones de la molécula del AcChR	5
Composición Polipeptídica	6
Disposición de las subunidades del AcChR	8
Topología transmembrana	9
Estructura secundaria del AcChR	13
Características funcionales del AcChR	14
Dinámica del AcChR	18
Interacción del AcChR con otros componentes de membrana	20
Interacción con proteínas	20
Interacción con lípidos de membrana	21

OBJETIVOS	30
-----------	----

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Obtención de membranas de <i>Torpedo</i> enriquecidas en receptor nicotínico de acetilcolina	31
2.- Purificación del AcChR mediante cromatografía de afinidad	31
3.- Reconstitución del AcChR en vesículas lipídicas de composición definida	33
3.1.- Preparación de vesículas lipídicas	33
3.2.- Procedimiento de reconstitución	34
4.- Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS)	34
5.- Preparación de la columna de Afinidad	35
5.1.- Síntesis de bromuro de bromoacetilcolina	35
5.2.- Derivatización del Affigel 10	35
5.3.- Determinación de grupos tioles	36
6.- Purificación de α -bungarotoxina a partir del veneno de la serpiente <i>Bungarus multicinctus</i>	36
6.1.- Cromatografía de intercambio iónico y filtración	36
6.2.- Cromatografía líquida de alta resolución	37
7.- Estudios de unión ^{125}I - α -bungarotoxina al AcChR	38
7.1.- Cromatografía de intercambio iónico de ^{125}I - α bungarotoxina	38
7.2.- Determinación del número de sitios de unión de α -bungarotoxina al AcChR	38
8.- Obtención del AcChR en forma monomérica	39
9.- Proteolisis del AcChR	39
10.- Determinación de la concentración de fosfolípidos	40
11.- Cuantificación de proteínas	40
12.- Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier	41
13.- Calorimetría Diferencial de Barrido	42
14.- Adición de sondas fluorescentes	43
15.- Medidas espectroscópicas	44

16.-Transferencia de energía por resonancia (R.E.T.)	46
16.1.- Cálculos preliminares	46
16.2.- Medida de la eficiencia de energía	47
17.- Recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueo (FRAP)	48
17.1.- Determinación del radio del haz circular del láser	49
17.2.- Marcaje con FITC	49
17.3.- Preparación de multicapas lipídicas para FRAP	49
18.- Análisis de la actividad del AcChR mediante técnicas de cinética rápida	50
18.1.- Encapsulación de fluoróforo en vesículas con AcChR	50
18.2.- Preparación de la columna de cromatografía de exclusión	51
18.3.- Adquisición de datos	51
19.- Síntesis de la sonda fluorescente β -DPH HPA	52
19.1.- Cromatografía en capa fina (TLC)	53

RESULTADOS

1.- El receptor nicotínico de acetilcolina reconstituido en vesículas lipídicas de composición compleja segrega un dominio lipídico	54
1.1.- Estudios de la reorganización lipídica inducida por el AcChR mediante FTIR	54
1.2.- Estudios de DSC sobre la reorganización lipídica inducida por el AcChR reconstituido en vesículas lipídicas	57
1.3.- Estudios de Anisotropía de Fluorescencia sobre la reorganización lipídica inducida por el AcChR reconstituido en vesículas lipídicas	58
2.- Composición del dominio lipídico	62
3.- Estequiometría del dominio	66
4.- Localización del dominio	69
4.1.- Estudios de transferencia de energía por resonancia	69
4.2.- Estudios de FRAP	73
5.- El DMPA en el dominio no se comporta como el DMPA puro	74
6.- Estabilidad y dinámica del dominio: interacciones lípido-proteína	80
7.- La estructura y función del AcChR dependen de la composición lipídica de la membrana en que se reconstituye la proteína	88
7.1.- Actividad del AcChR reconstituido en diferentes matrices lipídicas	88
7.2.- Estructura secundaria del AcChR reconstituido en diferentes matrices lipídicas	90
7.3.- Análisis de la estabilidad térmica del receptor nicotínico de acetilcolina reconstituido en diferentes matrices lipídicas mediante “espectroscopia diferencial de barrido”: consecuencias estructurales	94
8.- El dominio lipídico como potencial diana farmacológica	96
9.- Síntesis de la sonda β -DPH HPA	98

DISCUSIÓN

Detección del dominio lipídico segregado por el AcChR	102
Estudio del dominio mediante Anisotropía de fluorescencia	103
β -DPH HPA como sonda fluorescente para detectar el dominio	105
Estudio del dominio mediante DSC	108
Estequiometría del dominio	111
Estudio de la Capacidad Calorífica	114
Estudio del dominio mediante FT-IR	116
Estudio del dominio mediante FRAP	119
Composición del dominio: presencia del Colesterol	120
Alteración de las propiedades del DMPA en el dominio	122
Localización del dominio	126
Factores implicados en la formación del dominio	128
Segmentos transmembrana del AcChR	129
Cabeza polar de los fosfolípidos	133
Cadenas alifáticas de los fosfolípidos	134
Equilibrio Estado de reposo-Estado desensibilizado del AcChR	134
Equilibrio Monómero-Dímero del AcChR	135
Tramos extramembrana del AcChR	135
Estudios funcionales del AcChR	136
Estructura secundaria del AcChR	138
Interfase lípido-proteína como diana farmacológica	143
Modelo del dominio lipídico segregado por el AcChR	144
Papel fisiológico del dominio	145

CONCLUSIONES

149

BIBLIOGRAFÍA

151

APÉNDICE

1.- Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier	174
1.1.- Introducción	174
1.2.- Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier	174
1.3.- Estudio de muestras biológicas	176
1.4.- Aspectos teóricos de la espectroscopia infrarroja	176
1.5.- Asignación de bandas de infrarrojo en proteínas	177
1.6.- Bandas de absorción del agua	178
1.7.- Procesamiento de datos y técnicas de aumento de resolución	178
1.7.1.- Deconvolución de Fourier	179
1.7.2.- Derivada	180
1.7.3.- Eliminación del ruido	181
2.- Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	182
3.- Anisotropía de fluorescencia	183
4.- Polarización generalizada de fluorescencia	186
5.- Transferencia de energía por resonancia	187
5.1.- Análisis de los datos de transferencia de energía por resonancia	188
6.- Obtención de parámetros cinéticos de la actividad del AcChR	191

INTRODUCCIÓN



Descripción general del AcChR

En los animales superiores, las comunicaciones intercelulares más rápidas y complejas están mediadas por impulsos nerviosos transmitidos por las neuronas a modo de corrientes eléctricas. Alrededor de los años 50, con la introducción de nuevas técnicas fisiológicas se pudo demostrar la existencia de dos tipos de comunicación entre las neuronas, denominadas sinapsis química y eléctrica. Gracias a los estudios de microscopía electrónica se pudo demostrar que la transmisión sináptica sólo tiene lugar en zonas críticas del sistema nervioso donde las regiones especializadas de las neuronas presinápticas y postsinápticas están debidamente enfrentadas. En base a la morfología de estas zonas, las sinapsis se pueden dividir en dos clases: aquellas en las que el citoplasma de la célula pre y postsináptica están en contacto a través de las denominadas “gap junction”, y aquellas otras en las que las neuronas en contacto están separadas por una hendidura de unos 30-50 nm denominada hendidura sináptica (Kandel y Siegelbaum, 1985). Estas dos clases morfológicas se corresponden con las dos clases funcionales de sinapsis: eléctrica y química. En la sinapsis química, la transmisión del impulso nervioso entre dos neuronas se produce por la liberación de un compuesto químico, denominado neurotransmisor, desde la terminación nerviosa presináptica a la hendidura sináptica, estimulando la célula adyacente al unirse a receptores específicos. Este tipo de transmisión sináptica rápida ocurre igualmente tanto en el sistema nervioso central como en el periférico, en el que se incluiría las sinapsis entre las neuronas motoras y los músculos a través de lo que se conoce como unión neuromuscular (**figura 1**), o entre neuronas y glándulas. Los receptores a los que se unen los neurotransmisores son canales iónicos cuya apertura está condicionada por la unión del neurotransmisor, formando una superfamilia conocida como canales iónicos activados por ligando (LGIC). A esta superfamilia de canales pertenecerían algunos de tipo excitatorio, como son el receptor nicotínico de acetilcolina (AcChR), que se encuentra en músculo esquelético, neuronas, y órgano eléctrico de algunos peces (*Torpedo marmorata*, *Torpedo californica*, *Electrophorus electricus*), el receptor de serotonina-(5-HT), canales extracelulares de ATP y glutamato, todos ellos selectivos al transporte de cationes. Sin embargo, algunos son de tipo inhibitorio como el receptor de γ -amino butírico (GABA_A y GABA_C), el de histamina (invertebrados), el de acetilcolina (invertebrados) y el de glicina, que conducen iones Cl⁻. Todos estos receptores comparten un alto grado de homología de secuencia, lo que sugiere que posiblemente evolucionaron a partir de un gen ancestral común. Asimismo, la estructura primaria está muy conservada a lo largo de la evolución, con un 80% de identidad de secuencia entre la subunidad α del AcChR humana y de *Torpedo*.

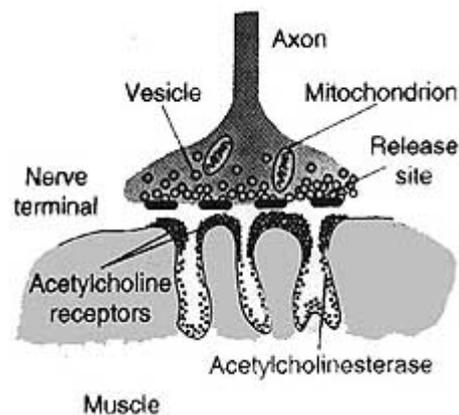


Figura 1 Esquema de la unión neuromuscular. En este esquema se aprecia el terminal del axón de una neurona motora que inerva una fibra muscular, donde se situarían las moléculas de receptor nicotínico de acetilcolina.

El AcChR, cuyo ligando es la acetilcolina, es el modelo prototipo de toda la superfamilia de receptores activados por ligando y su mecanismo de actuación ha sido ampliamente estudiado (Katz, 1966): tras la liberación de acetilcolina por la terminación nerviosa presináptica, se alcanza una concentración en el espacio sináptico de 0.1 a 1 mM, produciéndose una rápida difusión a través de la hendidura sináptica. En la membrana postsináptica, la acetilcolina se une a su receptor específico, lo cual da lugar a la apertura del canal iónico asociado al receptor, permitiendo el paso de cationes a favor de su gradiente electroquímico. Esta translocación de iones provoca una despolarización de la membrana que puede llevar en último término a la contracción muscular o a la transmisión de la señal nerviosa, dependiendo del tipo de tejido que se encuentre implicado.

La molécula de acetilcolina es liberada en "zonas activas" (densas a los electrones) de la membrana plasmática presináptica de una terminal nerviosa por fusión con la membrana celular de vesículas que contienen este neurotransmisor (Reichardt y Kelly, 1983). Las vesículas presinápticas, que pueden ser observadas por microscopía electrónica, contienen acetilcolina (Whittaker et al., 1964); este descubrimiento sirve de base a la hipótesis vesicular (Katz, 1962) y da una posible explicación a la liberación cuantal de acetilcolina (Kuffer y Yoshikami, 1975). La fusión de las vesículas con la membrana presináptica se produce por la entrada de Ca^{2+} a través de canales de calcio sensibles a voltaje. Este flujo es debido al cambio de potencial producido por la onda de despolarización a lo largo del axón presináptico, mediado por canales de sodio dependientes de voltaje. Además de la hipótesis vesicular hay alternativas que cuestionan si este mecanismo es o no el único que utilizan las células para la liberación de acetilcolina. Otro mecanismo postulado es la existencia de una proteína transportadora que estaría activada por Ca^{2+} (Cooper y Meyer, 1984; Dunant e Israel,

1985). Según esta hipótesis, las vesículas que se observan al microscopio electrónico, tendrían como función principal el almacenamiento de acetilcolina, sin estar implicadas en su liberación.

La molécula que convierte la señal de acetilcolina en una respuesta eléctrica es el receptor nicotínico de acetilcolina (AcChR). Esta proteína ha sido el primer receptor para neurotransmisores que se ha definido como una entidad molecular, que se ha aislado y purificado en forma activa y que se ha reconstituido en sistemas artificiales de membrana con retención cuantitativa de sus propiedades fisiológicas. Este receptor es, por lo tanto, una de las proteínas integrales de membrana de las que se dispone actualmente de abundante información estructural y funcional, sirviendo como modelo para el estudio de tales componentes biológicos. Además, es susceptible de estudio a niveles de organización muy diferentes, desde técnicas de secuenciación con proteína purificada y registros electrofisiológicos a técnicas de clonaje del DNA correspondiente (Popot y Changeux, 1984; Stroud y Finer-More, 1985; Numa et al., 1983, Conti-Tronconi et al., 1982; Karlin, 1983). El hecho de que el AcChR sea el receptor de superficie celular mejor conocido se debe principalmente a dos factores:

1.- La existencia de una fuente abundante en este receptor, como es el órgano eléctrico presente en varias especies de peces: *Torpedo marmorata*, *Torpedo californica*, *Electrophorus electricus*, etc.

2.- La presencia de α -neurotoxinas en veneno de serpiente, que resultan ser ligandos altamente específicos del AcChR y que han aportado un modo fácil de realizar determinaciones cuantitativas mediante ensayos de unión a equilibrio.

Los peces eléctricos de los géneros *Torpedo* y *Electrophorus* constituyen un material experimental idóneo para los estudios de la sinapsis de acetilcolina por la elevada abundancia de terminaciones nerviosas que se establecen en el órgano eléctrico, sistema neuromuscular altamente especializado cuyo mecanismo de transmisión del estímulo eléctrico es idéntico al mecanismo presente en la unión neuromuscular, presentando la ventaja de carecer de la complicada estructura contráctil de la célula muscular o del complejo sistema de circuitos de una neurona. La posibilidad de obtener membranas ricas en AcChR procedentes del órgano eléctrico de *Torpedo* en grandes cantidades y el alto grado de homología que este receptor tiene con el receptor nicotínico de músculo esquelético (Stroud y Finer-Moore, 1985), hacen de esta proteína uno de los mejores sistemas modelo para estudiar la estructura y función de proteínas transmembrana en general y de canales activados por ligando en particular.

Un ejemplar típico de *Torpedo marmorata*, la especie mediterránea, mide unos 40 cm de longitud y pesa alrededor de 2 Kg. Los dos órganos eléctricos están situados a ambos lados del cuerpo y representan aproximadamente una quinta parte del peso del mismo (**figura 2**).

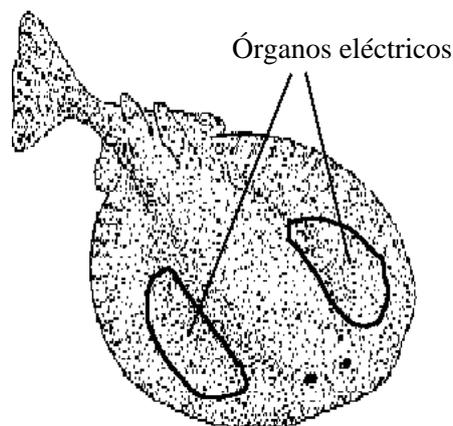


Figura 2. Ilustración de un ejemplar típico de *Torpedo Marmorata*. Se ha superpuesto sobre el dibujo el contorno aproximado de los órganos eléctricos.

Cada órgano consta de unos 400 prismas cuyos ejes van de la cara ventral a la dorsal, siendo cada prisma un apilamiento de células planas llamadas electrocitos que presentan una resistencia eléctrica alta en su membrana ventral y baja en la dorsal. Las sinapsis se realizan exclusivamente en la membrana ventral de cada célula y en total existen más de 500.000 millones de terminaciones en cada órgano; todas segregan simultáneamente acetilcolina en respuesta a la llegada de un estímulo. La acetilcolina se une a sus receptores específicos situados en la cara ventral de la célula postsináptica, produciendo la apertura de los mismos y la entrada masiva de iones sodio a su través ($10^4 \text{ Na}^+/\text{ms}$), estableciéndose, como consecuencia, una corriente eléctrica que se propaga por el agua del mar, llegándose a alcanzar corrientes de más de 7 Amperios (Dunant e Israel, 1985).

A pesar de las similitudes entre los diferentes AcChR, generalmente se distinguen dos grupos de estos receptores. Los de tipo neuronal y los de tipo muscular, considerándose a estos últimos homólogos al del órgano eléctrico del *Torpedo*. Esta división se debe a las diferencias estructurales y funcionales que existen entre estos tipos de AcChR, que aunque puedan parecer en un principio pequeñas, son vitales para que logren desarrollar adecuadamente su función fisiológica. La memoria de la presente Tesis se centra en el receptor de acetilcolina muscular y por ello, a partir de este punto todas la descripciones que se realicen, a no ser que haya una mención explícita, vendrán referidas a este subtipo.

Características estructurales del AcChR

Forma y dimensiones de la molécula del AcChR

La forma de la molécula del AcChR se ha analizado mediante diversos métodos que incluyen técnicas de marcaje de las membranas ricas en AcChR con anticuerpos anti-receptor, microscopía electrónica, difracción de rayos X de bajo ángulo y técnicas de criofractura. La mayor resolución obtenida de esta proteína se ha obtenido en estudios de criomicroscopía electrónica mediante las imágenes de membranas postsinápticas de *Torpedo marmorata* en hielo amorfo, en el que forman cristales tubulares. Sucesivos análisis de estas imágenes han logrado alcanzar una resolución de 4.6 Å (Miyazawa et al., 1999), todavía insuficiente como para establecer con precisión molecular la estructura de esta proteína. Obtener una resolución mayor será muy difícil, a no ser que se consiga cristalizar esta proteína para poder aplicar técnicas de difracción de rayos X. Por ello, el camino que se está siguiendo en la obtención de una estructura tridimensional de la proteína, es la combinación de resultados provenientes de diferentes aproximaciones experimentales.

El receptor nicotínico de acetilcolina es una partícula cilíndrica de 85-90 Å de diámetro externo y 110 Å de largo, con una región de 55-65 Å en la parte sináptica y otra de 15-20 Å en la parte citoplásmica. En la región transmembrana el diámetro es de ~65 Å. Estas partículas presentan un poro central que atraviesa la membrana de ~7 Å, flanqueado por dos “vestíbulos” de aproximadamente 20-30 Å de diámetro rodeado de cinco regiones densas a los electrones que se asocian con las cinco subunidades del AcChR, dispuestas alrededor de un eje de pseudosimetría perpendicular al plano de la membrana (Kubalek et al., 1987, Toyoshima y Unwin, 1990), **figura 3A**. Cerca del centro del poro, aunque levemente hacia el lado citoplásmico se detecta una zona ligeramente densa que podría corresponder con la puerta o “gate” del canal, es decir, la parte de la proteína que permite o no el paso de los iones a su través. En los dos sitios de unión a agonista en las subunidades α se han resuelto ciertos elementos de estructura secundaria e incluso se pueden detectar ligeros cambios en la forma entre uno y otro (Unwin, 1993), observándose cavidades conectadas a los vestíbulos que contienen agua por túneles estrechos de 10-15 Å de longitud formados aparentemente por hojas β . Por otro lado, en la última revisión de este tipo de imágenes, en las que la resolución llega a 4.6 Å (Miyazawa et al., 1999), se han detectado aperturas estrechas (<10 Å de diámetro) en la pared del receptor cerca de la superficie citoplasmática, formando pasajes transversales para la salida de los iones. Su función podría ser la de servir como filtros para impedir que los aniones, grandes cationes y moléculas impermeables lleguen a las proximidades del poro desde el citoplasma. Para ello se valdrían de su pequeño tamaño y de la carga negativa de alguno de los residuos que los flanquean, **figura 3B**.

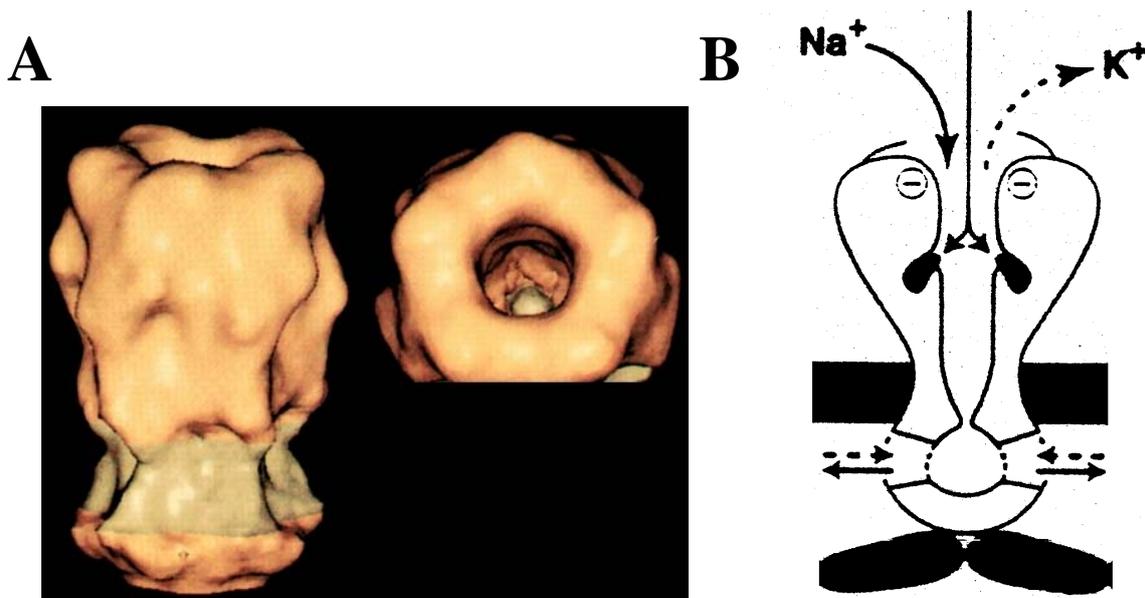


Figura 3. Modelo tridimensional de la molécula del AcChR. (A) Reconstrucción tridimensional de la molécula de AcChR vista de lado o desde la hendidura sináptica (arriba). Este modelo está basado en los datos obtenidos por microscopía crioelectrónica de resolución 9 Å en dos dimensiones y reconstruidas en un objeto 3D aplicando técnicas de promediado de grupos de imágenes en 2D. Figura tomada de Barrantes, 1998. (B) Según este modelo, el AcChR es una estructura cilíndrica que atraviesa la membrana celular, en donde las cinco subunidades se encuentran dispuestas alrededor de un poro central formando el canal iónico. Se detallan los sitios de unión a agonista al que se accedería a través de unos túneles y las aperturas en la región citoplasmática a través de los cuales salen los cationes que han atravesado el canal iónico. Estas aperturas estarían flanqueadas por residuos cargados negativamente que podrían ayudar a excluir aniones de las cercanías del poro. Figura tomada de Miyazawa et al., 1999.

Cada una de estas estructuras anulares correspondería a la forma monomérica del AcChR, mayoritaria en órgano eléctrico de *E. Electricus* y músculo. Sin embargo, en el órgano eléctrico de *Torpedo*, el AcChR se encuentra predominantemente como dímero, formado por dos de estas estructuras anulares contiguas, con una separación media de 95 Å entre sus respectivos ejes (Conti-Tronconi y Raftery, 1982; Changeux et al., 1984; Stroud y Finer-More, 1985).

Composición polipeptídica

El AcChR de órgano eléctrico es una glicoproteína transmembrana con un peso molecular de aproximadamente 290.000 daltons (para revisiones ver, Galzi, et al., 1991, Lester, 1992 y Karlin, 1993) y consta de cuatro tipos de subunidades polipeptídicas con pesos moleculares aparentes, determinados por su movilidad electroforética en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (PAGE-SDS), de 40.000 (α), 50.000 (β),

60.000 (γ) y 65.000 (δ), ver **tabla 1**, en una relación estequiométrica 2:1:1:1 (Reynolds y Karlin, 1978; Lindstrom et al., 1980), como se demuestra por microsecuenciación aminoterminal y por secuenciación cuantitativa determinada directamente en la mezcla de polipéptidos obtenidos por desnaturalización con SDS del AcChR purificado. En el caso del AcChR procedente de músculo, la subunidad δ fetal es substituida por la subunidad ϵ (Takai et al., 1985), proporcionándole algunas diferencias funcionales. Para los AcChR neuronales hay una gran cantidad de subunidades diferentes que pueden combinarse para dar receptores funcionales aunque todas son de tipo α o β .

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas del receptor nicotínico de acetilcolina de *Torpedo californica*. Tabla tomada de Hucho, 1986.

Propiedad	Valor
Peso Molecular:	
Proteína	267.980
Glicoproteína	290.000
Coefficientes de sedimentación:	
Monómero	9 S
Dímero	13 S
Radio de Stokes (monómero)	7.0 nm
pI	4.9
Estructura cuaternaria	$\alpha_2\beta\gamma\delta$
Peso molecular de las cadenas polipeptídicas deducidas a partir de las secuencias de cDNA (peso molecular aparente obtenido mediante PAGE-SDS)	α 50.2×10^3 (40×10^3) β 53.7×10^3 (48×10^3) γ 56.3×10^3 (60×10^3) δ 57.6×10^3 (68×10^3)
Lugares de unión:	
Para agonistas y antagonistas	2
Para inhibidores no competitivos de alta afinidad	1
Componentes no proteicos	
Grupos fosfato	7 residuos por monómero
Carbohidratos	75 residuos por molécula
Residuos de ácido siálico	9
Ca ²⁺	Muchos

La amplia homología existente entre las subunidades que componen el AcChR se ha puesto de manifiesto al analizar sus secuencias aminoacídicas. Esta homología inicialmente identificada a nivel de aminoácidos ha sido corroborada por la secuenciación de todas las cadenas a nivel de ADN complementario (Noda et al., 1983). Los genes de estos productos presentan una gran homología a pesar de la existencia de varias inserciones y deleciones entre unas cadenas y otras, como es característico en secuencias de proteínas relacionadas evolutivamente. Las secuencias precursoras de las cuatro cadenas polipeptídicas comienzan con una secuencia hidrofóbica de 17 a 24 aminoácidos, confirmando que cada subunidad es el producto de un gen individual.

Disposición de las subunidades del AcChR

Debido al alto grado de homología existente entre todas las subunidades que componen el AcChR, es fácil pensar que éstas se encuentran dispuestas en una situación pseudosimétrica alrededor de un eje de simetría que pasaría a través del poro central (Karlin et al., 1983; Brisson y Unwin, 1985). Los mapas tridimensionales obtenidos a partir de vesículas ricas en AcChR, mediante análisis de imágenes procedentes de microscopía electrónica, han demostrado que el receptor es una molécula cilíndrica que se sitúa perpendicularmente al plano de la membrana postsináptica y cuyas subunidades se encuentran dispuestas simétricamente alrededor de un poro central, presumiblemente el canal iónico (Toyoshima y Unwin, 1990, Unwin, 1998). Sin embargo, la resolución de este tipo de análisis es insuficiente para describir la estructura interna de las subunidades.

El uso de fragmentos F_{ab} de anticuerpos monoclonales frente a la subunidad α , junto con técnicas de microscopía electrónica, ha permitido determinar la posición relativa que mantienen entre sí las dos subunidades α presentes en cada molécula del AcChR a partir del ángulo que se forma entre los dos F_{ab} unidos y el eje central. De este modo, se ha establecido que el ángulo medio que forman las subunidades α en el monómero es de $144 \pm 4^\circ$ (Fairclough et al., 1983), demostrando que estas subunidades están separadas por alguna otra subunidad y, por lo tanto, están en entornos intrínsecamente diferentes dentro del complejo ensamblado. Diferentes tipos de experimentos basados en micrografía electrónica, fotomarcaje, entrecruzamiento de subunidades o expresión omitiendo alguna de las subunidades, indican que es la subunidad γ aquella que está entre las dos α y que los sitios de afinidad a ligando están formados por los pares $\alpha\gamma$ y $\alpha\delta$ (Karlin et al., 1983; Blount y Merlie, 1989; Sine y Claudio, 1991; Pedersen y Cohen, 1990; Czajkowski y Karlin, 1995). El consenso actual es que la subunidad γ está entre las dos subunidades α (revisiones, Karlin y Akabas, 1995; Karlin, 1993), **figura 4**. Asimismo, experimentos usando análogos fotoactivables de una α -neurotoxina indican que la disposición de las subunidades es

$\alpha\gamma\alpha\delta\beta$ y no $\alpha\gamma\alpha\beta\delta$ (Machold et al., 1995). Otros autores, utilizando reactivos de entrecruzamiento y/o técnicas de resolución de imágenes, han llegado a la conclusión de que es la unidad β y no la γ la que se encuentra entre las dos subunidades α , en contradicción con lo anteriormente expuesto (Kistler et al., 1982; Hamilton et al., 1985, Kubalek, et al., 1987; Unwin, 1993; Unwin, 1995; Unwin, 1996; Chatrenet, et al., 1990; Mihovilovic y Richman, 1984).

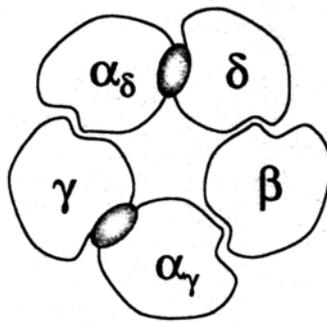


Figura 4. Disposición de las subunidades en el AcChR. La subunidad γ se encuentra entre las dos subunidades α . También se señalan los sitios de unión a agonista. Figura tomada de Kotzyba-Hibert et al., 1999.

Topología transmembrana

La primera prueba de que el AcChR es una proteína integral de membrana y que la atraviesa de parte a parte se ha obtenido examinando al microscopio electrónico vesículas ricas en AcChR, intactas o sonicadas, enfrentadas con anticuerpos anti-receptor, observándose que los anticuerpos se unen al AcChR tanto desde la cara interna como desde la cara externa. A la misma conclusión se ha llegado comparando los efectos que las proteasas ejercen sobre el AcChR solubilizado y sobre el receptor incorporado en vesículas impermeables cuando actúan desde la cara interna o desde la cara externa de las vesículas. Se ha demostrado así que en todos los casos se produce degradación de las cuatro subunidades y, por análisis de los productos de degradación, se ha concluido que todas ellas atraviesan la membrana y que sobresalen por fuera de ella en la misma cantidad en cada subunidad hacia el lado citoplasmático de forma proporcional a su peso molecular (Conti-Tronconi y Raftery, 1982; Raftery et al., 1983).

La disposición transmembrana del AcChR muestra cierta asimetría con respecto a las regiones citoplasmática y extracelular, tal como se deduce de los diversos experimentos electrofisiológicos en los que se demuestra que:

1. La acetilcolina produce la apertura del canal iónico asociado al AcChR únicamente cuando se une por la superficie extracelular del mismo.
2. El canal iónico presenta diferente afinidad por ligandos farmacológicos dependiendo del lugar por donde estos ligandos interaccionen con el AcChR.

3. Cada subunidad presenta restos de azúcares hacia el lado extracelular y sitios de fosforilación en el lado citoplasmático.

Se ha determinado la secuencia aminoacídica completa de cada una de las subunidades del AcChR, comprobándose la existencia de un alto grado de homología entre todas ellas y con subunidades de receptor GABA_A, 5-HT y receptores de glicina, revelando unas amplias relaciones evolutivas. La homología en estructura primaria y secundaria sugiere que los canales iónicos activados por ligando (LGIC) proceden todos de un ancestro común. Dentro del AcChR y debido a esta homología antes mencionada entre todas sus subunidades, se ha sugerido que cada una de ellas se dispone de forma equivalente en la proteína, de manera que cada residuo aminoacídico equivalente en la secuencia lineal ocupará posiciones equivalentes en el espacio tridimensional de cada subunidad. Según este modelo, las diferencias entre subunidades vendrían dadas por las que hubiese en la estructura primaria y no en la secundaria o terciaria (Fairclough et al., 1983; Kosower, 1987).

El análisis de la distribución de las hidrofobicidades medias de un corto número de aminoácidos a lo largo de cada cadena polipeptídica del receptor conduce a la división de las subunidades en 4 regiones:

1- Un dominio hidrofílico situado en el extremo amino terminal compuesto por 210-220 aminoácidos y que supone aproximadamente el 50% de la masa de la proteína.

2- Una región muy hidrofóbica compuesta por 70 residuos.

3- Un segundo dominio hidrofílico de longitud variable (109-142 aminoácidos) generalmente más largo en las subunidades neuronales. El residuo de cisteína que posibilita la formación de dímeros de AcChR se encuentra en esta porción, aunque sólo en la subunidad δ .

4- Una región formada por 20 residuos hidrofóbicos situada en el extremo carboxi terminal.

En base a estos datos, se han propuesto varios modelos estructurales de la disposición de cada subunidad en la membrana plasmática (Popot y Changeux, 1984; Noda et al, 1983; Devillers-Thiery et al., 1983; Guy, 1984; Finer-Moore et al., 1984). Todos ellos tienen en común tres características principales:

a- La orientación del extremo amino terminal hacia el lado extracitoplasmático.

b- La orientación de un pequeño dominio hidrofílico hacia el interior celular.

Los modelos propuestos asumen que el sitio de unión de la acetilcolina se encuentra en el dominio hidrofílico N-terminal de la subunidad α y que las paredes del canal iónico rodean al eje de simetría de la proteína, estando constituido por porciones homólogas de cada subunidad. Los distintos modelos se diferencian en el número, la orientación y la identidad de los segmentos transmembrana (**figura 5**).

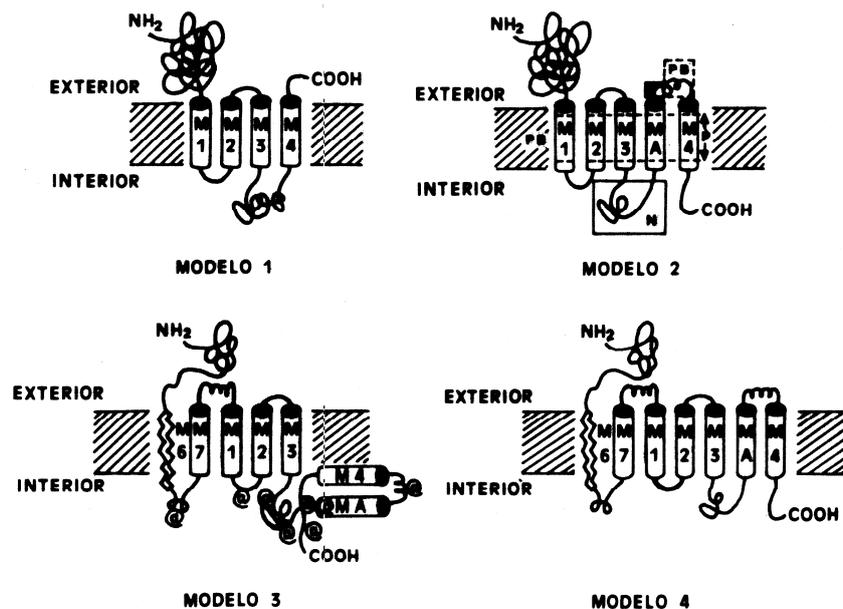


Figura 5. Modelos de la estructura terciaria del AcChR. Los modelos que se presentan han sido propuestos por diferentes autores y están basados en los perfiles de hidrofobicidad de las diferentes subunidades junto con el empleo de anticuerpos dirigidos contra secuencias específicas de la subunidad α . (1) Modelo de Noda et al., 1983. (2) Modelo de Finer-Moore y Stroud, 1984. P,B y N indican los lugares en donde se han inducido mutagénesis dirigida. (3) Modelo de Ratman et al., 1986. Los símbolos @ representan las regiones de unión de anticuerpos. (4) Modelo de Criado et al., 1985. Los cilindros representan las α -hélices y las figuras en zigzag las hojas β .

El modelo más aceptado actualmente es el propuesto por Karlin (Karlin, 1993), que coincidiría básicamente con el de Noda (Noda et al., 1983), **figura 5**, en el que cada subunidad estaría compuesta por un gran dominio N-terminal extracelular, 4 regiones transmembrana de M1 a M4 y un pequeño dominio extracelular C-terminal. El sitio de unión a ligando estaría generado en las superficies de unión entre las subunidades α con δ y α con γ , en el dominio extracelular. La pared del poro iónico del canal estaría formada por los segmentos M2 de cada una de las subunidades, junto a pequeñas porciones de M1. Los tramos M1, M3 y M4 estarían en contacto con la fase lipídica (Ortells et al, 1992), siendo el más hidrofóbico y el menos conservado de todos el M4. Los dominios M1 y M3 parecen importantes en el ensamblaje de las distintas subunidades (Wang et al., 1996) y en el “gating” del canal (Campos-Caro et al., 1997) respectivamente. Aunque el segmento M4 se ha considerado simplemente como un dominio encargado de aislar la parte funcional de la proteína del entorno lipídico, lo cierto es que mutaciones en alguno de sus residuos alteran el “gating” del canal, por lo que su papel podría ser mucho más importante de lo que se creía (Lasalde, et al, 1996). También se ha implicado a este dominio en la expresión funcional del AcChR en la superficie celular (Tobimatsu et al., 1987).

Tradicionalmente se les ha asignado una estructura en α -hélice a todos los tramos transmembrana, aunque actualmente este asunto está en discusión. Analizando imágenes de una resolución de 9 Å, Unwin (Unwin, 1993) propuso la existencia de hojas beta en M1, M3 y M4. Basándose en esta observación, hipotetizó que entre las hojas β de las distintas subunidades formarían un barril β rodeando las cinco α -hélices de los cinco segmentos M2, modelo apoyado por datos de FT-IR y CD del receptor tras una proteólisis de los segmentos extramembrana (Görne-Tschelnokow et al., 1994). Otros estudios han aprovechado el marcaje con distintas sondas para proponer la estructura secundaria de estos tramos transmembrana: hélice α para M2, excepto en tres residuos a mitad del canal iónico (Akabas et al., 1994), que coincide con el “pliegue” observado a mitad del poro iónico por Unwin (Unwin, 1993). El marcaje de los otros segmentos transmembrana sugiere que parte de los M3 y M4 son α -hélice mientras que la mitad de M1 no es helicoidal (Blanton y Cohen, 1994; Barrantes et al, 2000). Este estructura mixta de hélice α y hoja β ha encontrado apoyo en algunos modelos teóricos (Ortells y Lunt, 1996), **figura 6**.

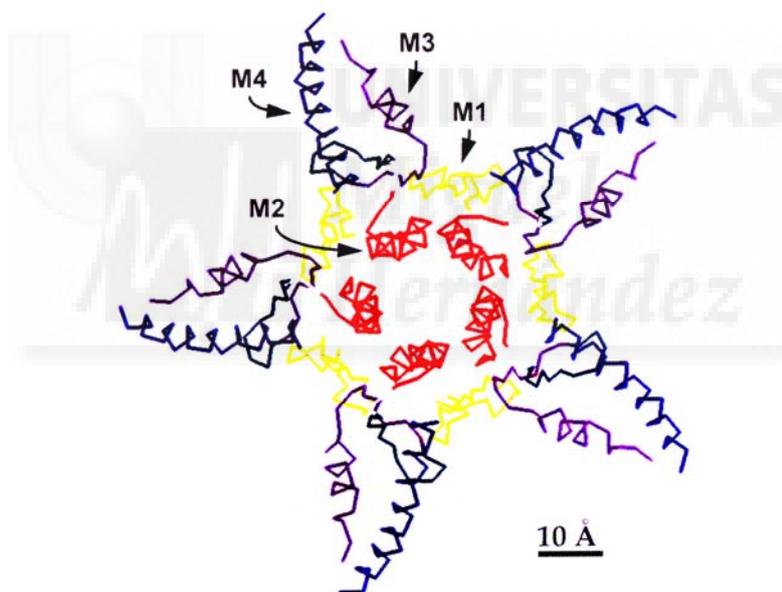


Figura 6. Modelo del AcChR en estado cerrado. Este modelo, desarrollado por Ortells y cols., está basado en la estructura cristalina de la enterotoxina. En él, se muestran los tramos transmembrana que forman el AcChR: M1 amarillo, M2 rojo, M3 púrpura y M4 azul. En verde, región anteriormente asignada a un "loop" entre M2 y M3 y ahora considerada parte de una hoja β dentro de la membrana. M2 flanquea el poro iónico y M3 y M4 son los segmentos más externos, en contacto con los lípidos. Figura tomada de Barrantes, 1998.

Los últimos experimentos en CD y FT-IR con la proteína entera o los péptidos resultantes de la proteólisis parcial del AcChR apuntan en el mismo sentido: M1 con parte de estructura no helicoidal (probablemente una hélice α distorsionada), y el resto en α -hélice (Corbin et al, 1998; Baenziger y Méthot, 1995; Méthot y Baenziger, 1998).

Estructura secundaria del AcChR

Los primeros datos sobre la estructura secundaria de las cuatro cadenas polipeptídicas, empleando técnicas de dicroísmo circular, indicaban que las cadenas estarían formadas por un 34% de α hélice y un 29% de hoja β (Moore et al., 1974), ó 23% α hélice, 43% hoja β , 6% giros y 28% no ordenada (Mielke y Wallace, 1988). Mediante estudios de espectroscopía de Raman, en los que se analiza el espectro de la amida I, se obtiene un 25% de α -hélice, mientras que un 34% formaría hojas β (Yager et al., 1984). Con técnicas de infrarrojo aplicadas a la banda amida I se obtuvo 20% α -hélice y cantidades variables de hoja β (Fong y McNamee, 1987; Butler y McNamee, 1993), 39% α -hélice, 35% hoja β , 6% giros y 20% no ordenada (Méthot, N. et al, 1994) o 43% hélice α , 48% hoja β (Castresana, J. et al., 1992). Los datos difieren de forma apreciable de unos estudios a otros, probablemente debido a la inexactitud de los métodos de cuantificación de estructura secundaria a partir de la banda amida I (Echabe et al., 1997) y a las diferentes condiciones utilizadas en la reconstitución de la proteína. Esta variabilidad es importante, ya que el porcentaje de hélice α en la proteína es determinante para establecer cuál es el verdadero modelo topológico de la misma. Todos estos datos difieren en mayor o menor medida de la estructura secundaria que predice el análisis de la composición aminoacídica (Finer-Moore y Stroud, 1984), según la cual el 44% formaría α hélice mientras que un 27% constituiría hoja β . Para conciliar la disparidad existente entre las predicciones teóricas y las observaciones experimentales sobre la estructura secundaria del AcChR sería necesaria la obtención de estructuras tridimensionales de alta resolución. Gran parte del esfuerzo que se ha realizado para hallar la estructura secundaria del AcChR se ha centrado en los dominios transmembrana. En un principio se les adjudicó una estructura en α hélice a todos ellos, pero trabajos posteriores propusieron la presencia de estructura en hoja β . Los últimos resultados obtenidos mediante dicroísmo circular (CD), FT-IR o mediante fotomarcaje apuntan hacia una estructura en α hélice para todos estos dominios transmembrana excepto para M1, donde habría otro tipo de estructuras, que tentativamente podrían ser hoja β o una hélice α distorsionada (ver apartado “*Topología Transmembrana*” en este mismo capítulo). Asumiendo que los tramos transmembrana son α -hélices, el resto de la proteína estaría formada por estructura en hojas β , giros y no ordenada. En este caso, la presencia o no de estructuras en α -hélice en la región extramembrana dependería entonces de que la estimación de este tipo de estructura en la proteína total sea inferior o mayor al 17-19%, porcentaje asumido para los tramos transmembrana.

Características funcionales del AcChR

Como consecuencia de la unión de acetilcolina, se ha postulado que el receptor nicotínico responde provocando un cambio extensivo de conformación que afecta a todas las subunidades (Witzeman y Raftery, 1978; Lindstrom et al., 1979; Kistler et al., 1982) llevando a la apertura de un canal conductor de iones a través de la membrana plasmática siendo el único impulso de este proceso los enlaces no covalentes entre la acetilcolina y el sitio de unión, sin ningún otro aporte de energía (Jackson, 1989). Este canal conduce todos los cationes pequeños, pero predominantemente los iones Na^+ que son continuamente bombeados al espacio sináptico por la Na^+/K^+ ATPasa. Cada molécula de receptor de acetilcolina conduce aproximadamente 10^4 iones/ms (Popot y Changeux, 1984). Se han realizado experimentos utilizando ligandos fotoactivables con el fin de producir un aumento de la concentración de agonista. Los resultados obtenidos demuestran que la apertura del canal asociado al receptor se produce aproximadamente a los 10 μs después de la unión del ligando (Krouse et al., 1980). El flujo de iones sodio al interior celular produce una alteración del gradiente iónico que conduce a la despolarización de la membrana. De esta forma, la membrana celular que, normalmente, posee un gradiente de potencial de 100.000 Vcm^{-1} se transforma, en aproximadamente 50 μs , en un estado de alta conductancia (Stroud y Finer-Moore, 1985), traduciendo una señal química en una señal eléctrica que provoca la contracción del músculo en la unión neuromuscular. En el sistema nervioso central el AcChR es responsable de la transmisión nerviosa excitatoria.

La apertura del canal iónico asociado al AcChR se produce por la unión de, al menos, dos moléculas de acetilcolina al receptor (Sine y Taylor, 1980). Se ha demostrado que no hay cooperatividad en la unión de ligando, a pesar de que hay una cooperatividad en la apertura del canal que muestra un coeficiente de Hill de 1.97 ± 0.06 (Neubig y Cohen, 1980). La interpretación más común de estos datos es que las dos subunidades α , que son las que unen neurotoxinas, también unen acetilcolina y contienen los sitios de unión para la activación del agonista. Estos sitios de unión tienen normalmente baja afinidad (K_d 100 μM a 1mM) para agonistas (Raftery et al., 1983). En presencia constante de agonista, semejante a la requerida para los estudios de unión en equilibrio, la acetilcolina se une alrededor de 100 a 1000 veces más fuertemente a estos sitios (K_d 10 nM a 1 μM), es decir, con alta afinidad. Se dice entonces que el AcChR está desensibilizado, estado en el que no hay paso de iones a su través. Los dos sitios de unión de la acetilcolina no presentan propiedades simétricas y se diferencian, en concreto, en sus cinéticas de interacción con α -neurotoxinas (Maelicke et al., 1977; Watters, 1983) y en sus constantes de equilibrio de unión a d-tubocurarina (Neubig y Cohen, 1979; Sine y Taylor, 1980). Estos datos se correlacionan con el hecho de que las dos subunidades α tienen microentornos diferentes en la molécula del AcChR, y por lo

tanto distintas propiedades de unión de agonistas y antagonistas.

En condiciones fisiológicas, los tiempos de apertura media de canales individuales han sido descritos por dos distribuciones de Poisson, obteniéndose tiempos de 1 ms. El cierre del canal es espontáneo y se produce por la disociación de una de las dos moléculas de acetilcolina del receptor. La acetilcolina difunde a través del espacio sináptico y aquí es hidrolizada por el enzima acetilcolinesterasa localizado en la lámina basal. El mecanismo de acción de este enzima es sumamente rápido, impidiendo que el receptor pase al estado desensibilizado.

Con objeto de estudiar la correlación entre las propiedades dinámicas del AcChR y su función fisiológica se han desarrollado métodos cuantitativos para evaluar "in vitro" la eficacia del transporte de iones regulado por la acetilcolina, en una escala de tiempo de milisegundos. En este sentido se han utilizado diversas estrategias experimentales que incluyen técnicas de: 1) flujo amortiguado ("quench-flow") y filtración rápida con iones permeables, radioactivos o no (Andreasen y McNamee, 1977; Hess et al., 1979; Neubig y Cohen, 1980; Paraschos et al., 1982, 1983), que permiten monitorizar el flujo total de iones transportados; 2) técnicas de "patch-clamp" (Montal et al., 1984; Sine y Steinbach, 1984), que permiten estudiar los tiempos de apertura del canal iónico y registrar los potenciales producidos en moléculas individuales; y 3) técnicas de flujo detenido ("stopped-flow") (Moore y Raftery, 1980; Martínez-Carrión, 1984; González-Ros et al., 1984), que permiten monitorizar la cinética del transporte total de iones en una escala de tiempo próxima a la fisiológica.

A partir de los resultados obtenidos con las técnicas anteriormente citadas y apoyándose en la teoría alostérica, se han postulado diversos modelos cinéticos para el AcChR. Básicamente, todos ellos distinguen un mínimo de cuatro estados funcionales del receptor: de reposo (R), abierto (A), desensibilizado lento (D) y desensibilizado rápido (I), que se diferencian en la distinta afinidad por los agonistas y por el estado, cerrado o abierto, del canal iónico asociado (Conti-Tronconi y Raftery, 1982; Raftery et al., 1983; Changeux et al., 1984; Stroud y Finner-Moore, 1985; Karlin et al., 1986). En ausencia de agonistas, la mayoría de los receptores de Torpedo (80%) están en el estado de reposo (R) (Heidmann y Changeux, 1979), estando el 20% restante en su forma desensibilizada (D).

El estado de reposo se caracteriza por su baja afinidad (K_d 100 μ M a 1 mM) por los agonistas y porque el canal iónico está activable y cerrado al paso de cationes. La unión del agonista al AcChR posiblemente da lugar a un cambio conformacional del mismo originando así el estado abierto, proceso que lleva de microsegundos a milisegundos, y en el cual el canal iónico está abierto y presenta una conductancia media de 60 pS y una vida media de 1-10 ms. (Montal et al., 1984; Sine y Steinbach, 1984; Leibowitz y Dione, 1984). En presencia constante de agonista, el AcChR fluctúa

entre dos estados: conductor y no conductor durante varios milisegundos antes de entrar en un estado no conductor conocido como estado desensibilizado. Este fenómeno de desensibilización consta de dos procesos cinéticos: un proceso rápido, que se da en un rango de tiempo de 100 ms (Hess et al., 1979), y uno lento en un rango de segundos a minutos (Adams, 1981), teniendo en ambos casos el receptor una alta afinidad por los agonistas (K_d 1 nM a 1 μ M). Los datos disponibles sobre esas transiciones dan lugar a un modelo de cuatro estados (**figura 7**), que incluye un estado de reposo (R), un estado de canal abierto (A) y dos estados desensibilizados cerrados (I, D). En cada una de estas etapas la afinidad por el agonista aumenta dos ordenes de magnitud. Las constantes de velocidad para las transiciones entre los estados varían en 6 ordenes de magnitud, desde 10^4 s^{-1} para el canal activo a 10^{-2} s^{-1} para el de desensibilización lenta (Karlin et al., 1986). En ausencia del agonista, el AcChR recupera su estado de reposo de un modo lento, en un proceso de varios minutos de duración.

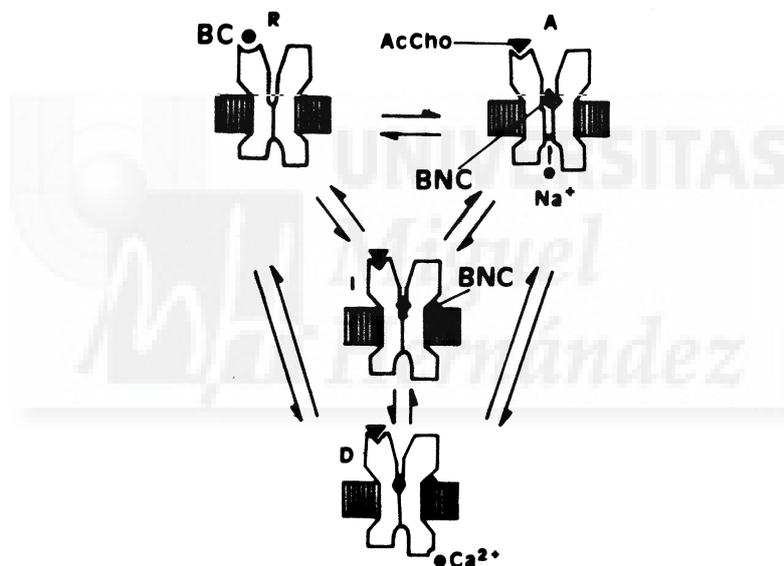


Figura 7. Esquema cinético de las transiciones entre los distintos estados de actividad del AcChR. Los distintos estados funcionales del AcChR, se diferencian en la afinidad por el agonista y en el estado del canal iónico. La unión de dos moléculas de AcCh al receptor en estado de reposo (R), produce la apertura del canal iónico asociado al mismo (A). La exposición prolongada al agonista provoca la desensibilización del receptor que puede ser un proceso rápido (100 ms, estado I) o bien lento de alrededor de segundos (estado D). Los estados R, D e I representan estados inactivos del AcChR con distinta afinidad por agonista. BC: bloqueador competitivo. BNC: bloqueador no competitivo. Figura tomada de Changeux, 1990.

Se ha propuesto un esquema cinético más complejo (**figura 8**), en donde se observa al igual que en el modelo anterior, el paso del estado abierto al desensibilizado sin necesidad de pasar por el estado cerrado. En este modelo se representa además la unión secuencial de las dos moléculas de acetilcolina al receptor, alcanzando éste el

estado abierto. Según este modelo no es necesaria la unión de dos moléculas de agonista para que el receptor pase al estado desensibilizado, (Hess et al., 1982), aunque experimentos posteriores mediante técnicas de flujo detenido apuntan a que la desensibilización desde el estado de reposo con un solo agonista unido es despreciable (Raines y Krishnan, 1998).

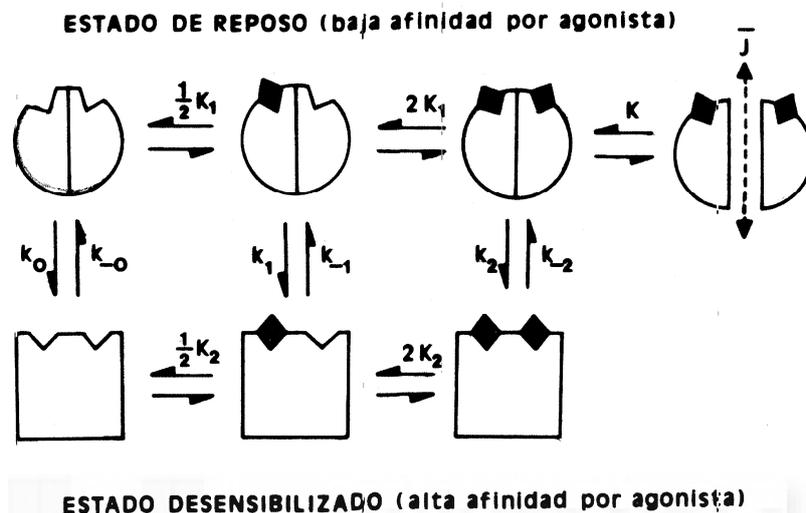


Figura 8. Esquema cinético de las transiciones entre los distintos estados de actividad del AcChR. En el esquema se incluyen además de los estados de actividad que se muestran en la figura 7, los estados desensibilizados del AcChR en ausencia o presencia de una molécula de agonista. Figura tomada de McNamee et al., 1986.

En los dos modelos antes descritos hay un equilibrio inicial entre el receptor desensibilizado y en reposo incluso en ausencia de agonistas. La mayor afinidad del estado desensibilizado por los agonistas es el único factor que provoca un desplazamiento en el equilibrio que conlleva la apertura y posterior desensibilización del canal. Sin embargo, hay trabajos que contradicen la existencia de este preequilibrio y que apuestan por un modelo secuencial ya que han encontrado ligandos que tienen mayor afinidad por el estado desensibilizado y sin embargo, no desplazan el equilibrio hacia esa conformación (Krauss et al., 2000).

Además de los efectos fisiológicos que produce la acetilcolina, otros muchos agentes modulan la actividad del receptor. Algunos de ellos son fisiológicos, entre los que se incluye el Ca^{2+} , quinasas para la fosforilación en sitios citoplasmáticos, enzimas de glicosilación y ácidos grasos. Los agentes no fisiológicos incluyen neurotoxinas de veneno de serpiente, curare, agentes descritos y usados clínicamente como relajantes musculares, tales como suberildicolina, y numerosos compuestos descritos ampliamente como inhibidores no competitivos o anestésicos locales (Stroud y Finer-Moore, 1985, Arias, 1998). Estos compuestos pueden alterar el estado funcional en el que se

encuentra el AcChR. Así, algunos antagonistas competitivos pueden hacer pasar al receptor del estado R al estado D como la d-tubocuramina, al igual que algunos bloqueadores no competitivos (BNCs) como el meproadifeno, fenciclidina, bromuro de etidio y proadifeno (Krodel et al., 1979; Heidmann et al., 1983). Algunos trabajos sugieren que la unión de ciertas sustancias, como los anestésicos locales o los bloqueadores no competitivos, conlleva la aparición de conformaciones intermedias entre el de reposo y el desensibilizado haciendo mucho más complejo el esquema funcional del AcChR (Ryan y Baenziger, 1999; Ryan et al., 2001)

Dinámica del AcChR

Como se ha podido comprobar en anteriores apartados de este capítulo, la complejidad de esta proteína es enorme. Por ello, el estudio de la misma se ha dividido en diferentes partes. Por un lado, la estructura de los sitios más importantes, como son los de unión a ligando, el canal iónico y la interfase lípido-proteína. Por otro lado, se ha estudiado la función de cada uno de ellos. En cada uno de estos aspectos hay resultados más o menos definitivos que nos dan una idea de cómo funciona la proteína, pero de una manera inconexa. Por tanto, falta por dilucidar cómo se transmite la “información” en el AcChR, es decir, la dinámica de funcionamiento de la proteína. En este sentido, Unwin (Unwin, 1995) mostró que la unión de agonistas al AcChR producía una transición estructural, comparando imágenes de la proteína en estado abierto y cerrado. Así pudo observar que la cavidad que se encuentra en las subunidades α y que se ha propuesto como los sitios de unión a ligando, desaparece en la estructura activada, y que la subunidad β se mueve alejándose de la subunidad α_δ hacia la α_γ . Esta coordinación de las dos subunidades α se propone como básica para el mecanismo cooperativo responsable de la apertura del canal. Estudios de marcaje con sondas fotoactivables apuntan a que en el estado cerrado, las hélices M2 se pliegan cerca del punto medio y por ello se acercan al eje central del poro para formar la puerta o “gate” del canal, compuesta por las largas cadenas laterales de residuos probablemente del anillo de leucinas (**figura 9**). Tras la activación, las hélices podrían inclinarse tangencialmente al eje central y asociarse, abriendo de este modo el canal al alejarse las cadenas laterales que forman la puerta del mismo y permitiendo que los residuos polares hidroxílicos se expongan al lumen (Kotzyba-Hibert et al, 1999; Tikhonov y Zhorov, 1998). En ese estado activado M1 podría formar parte del canal, asumiendo que todo o parte de ese segmento no es α -hélice como efectivamente algunos estudios señalan (Kim y McNamee, 1998). Este tipo de movimientos asociados a los cambios conformacionales de la proteína indicarían una modificación de la estructura terciaria o cuaternaria más que a cambios en la estructura secundaria de la misma.

Los estudios de estructura secundaria tampoco aportan datos precisos sobre la dinámica del receptor en procesos como la desensibilización. Este tema ha sido estudiado mediante CD, FT-IR y fotomarcaje principalmente. Mientras que en algunos trabajos se encuentran cambios en la estructura secundaria de la proteína entre el estado de reposo y desensibilizado (Castresana et al., 1992), que se traducirían en un descenso de la estructura en hoja β , y un aumento en estructura no ordenada, otros indican que no hay ninguna clase de cambios apreciables en la estructura secundaria de la proteína asociados a estos cambios conformacionales (Méthot et al., 1994; Mielke y Wallace, 1988; Baenziger et al., 1993), o que existen pequeños cambios en las regiones extramembrana (Baenziger y Chew, 1997)

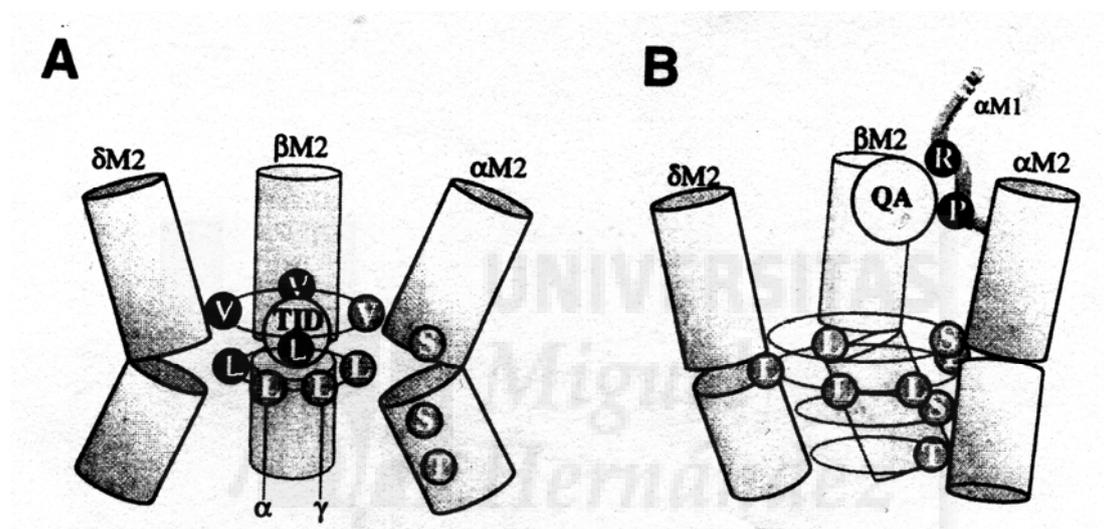


Figura 9. Dinámica de apertura del canal en el AcChR obtenida a partir del marcaje con inhibidores no competitivos. En el estado de reposo, los segmentos M2 se visualizan como α -hélices torcidas aproximadamente en su parte media de acuerdo a las imágenes obtenidas por Unwin (Unwin, 1995). El sitio de unión del TID en el estado de reposo está localizado en los anillos de valina y leucina. Cuando el agonista activa la proteína, el poro se abre al alejarse de su eje central las cadenas laterales de leucina, que formarían la compuerta del canal. Este movimiento permite que los residuos polares hidroxílicos queden expuestos al canal (serina y treonina), facilitando así la translocación de iones por el canal. Una parte de M1 llena el hueco debido al reordenamiento de las α -hélices de los segmentos M2 y contribuye al fotomarcaje con quinacrina en el estado abierto. Figura tomada de Kotzyba-Hibert et al, 1999.

Para estudiar la reorganización a nivel de aminoácido que ocurre en los sitios de unión a ligando durante la desensibilización, se ha utilizado la técnica de “flash” fotolisis acoplada a un aparato de flujo detenido (“stopped-flow”) y DDF como agonista. Las diferencias en este tipo de marcaje en el que el receptor está en estado de reposo, con los realizados en estado estacionario, en el que el receptor está

desensibilizado, indican que efectivamente hay un reordenamiento en la estructura terciaria del sitio de unión a agonista en los “loops” A y B de la subunidad α y en un “loop” de la subunidad δ (**figura 10**). Por lo tanto, esta subunidad podría estar implicada en el proceso de desensibilización del AcChR, ya que en la subunidad γ no sucede lo mismo (Galzi, et al., 1991).

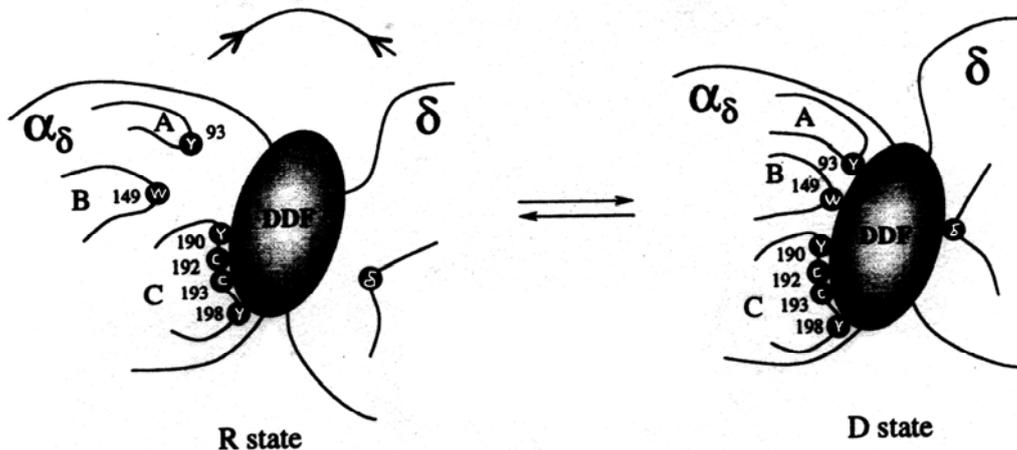


Figura 10. Dinámica del sitio de unión a agonistas del AcChR. Mediante marcaje con DDF se ha hecho un mapa conformacional del sitio de unión a agonistas en los estados R y D del AcChR. El sitio de unión de DDF en la subunidad α_δ , compuesto por una serie de “loops” peptídicos de las subunidades α y δ se muestra en los estados R y D. En los “loops” A (α Tyr93) y B (α Trp149) y el formado por la subunidad δ , aumenta el marcaje en el estado desensibilizado, por lo que han de estar más cerca del DDF en ese estado, pero un “loop” en la subunidad γ se aleja (en el sitio $\alpha\gamma$, no mostrado). El marcaje del loop C (α Tyr190, α Cys192, α Cys193, α Tyr198) permanece inalterado durante el proceso. Figura tomada de Kotzyba-Hibert et al, 1999.

En cualquier caso, se está todavía lejos de comprender a nivel molecular cada uno de los procesos en los que se podría dividir la funcionalidad del canal: unión a ligando, apertura de canal y desensibilización y más aún de dilucidar el mecanismo por el que se da el acoplamiento entre estos procesos. El asunto es en realidad más complejo aún ya que para tener un esquema completo del AcChR habría que comprender también cómo ejercen su efecto modulador algunas sustancias tales como lípidos, ácidos grasos, anestésicos, etc., sobre todos estos procesos.

Interacción del AcChR con otros componentes de membrana

Interacción con proteínas

El AcChR se encuentra en altas concentraciones en la membrana postsináptica de la unión neuromuscular, donde su densidad es de 10.000-20.000 moléculas por μm^2 (Conti-Tronconi y Raftery, 1982), mientras que fuera de la zona de sinapsis es 500 veces menor (Mathews-Bellinguer y Salpeter, 1978; Changeux et al., 1984). Los mecanismos moleculares responsables del mantenimiento de esta distribución no están completamente definidos; aunque se sabe que están implicadas proteínas del citoesqueleto de la célula postsináptica. Así, estudios de microscopía electrónica revelan la presencia de un material denso en el lado citoplasmático de la membrana, con una distribución que asemeja a la del AcChR (Sealock et al., 1984). Por otra parte, el tratamiento de vesículas de membrana obtenidas a partir de electrocitos de *T.marmorata* con una solución alcalina (pH 11), o su exposición a agentes caotrópicos (Neubig et al.; 1979; Sealock et al., 1984), solubiliza el material postsináptico denso a los electrones y provoca una mayor difusión lateral y rotacional del AcChR sin que se produzcan otros efectos en las demás propiedades del receptor (Conti-Tronconi et al., 1982; Changeux et al., 1984).

La proteína más abundante en los extractos alcalinos de las membranas postsinápticas de electrocitos de *T. marmorata* tiene un peso molecular de 43 Kd. Es una proteína periférica de membrana localizada en la cara citoplasmática de ésta, claramente diferenciada de la actina (Burden et al., 1983). Se encuentra en concentraciones similares al AcChR y no es esencial para la apertura del canal iónico activado por acetilcolina. Aunque a esta proteína se le han asignado diversas funciones en la sinapsis, ninguna de ellas se ha demostrado. La hipótesis más atractiva consiste en que la proteína de 43K interacciona de una manera no covalente con el AcChR, a través del segmento hidrofílico que une M3 con M4, con objeto de anclar al receptor en la membrana postsináptica y, así, mantener una alta concentración de receptores cerca de los sitios de liberación del neurotransmisor (Phillips et al., 1991; Conti-Tronconi y Raftery, 1982).

En experimentos de reconstitución de la proteína de 43K marcada con ^{125}I , en liposomas de composición definida, se ha demostrado que esta proteína se une estrechamente a los liposomas y que esta unión se puede revertir por tratamiento alcalino a pH 11. Esta disociación podría ocurrir como consecuencia de una repulsión de cargas entre la proteína y los lípidos, ya que la proteína 43K tiene un pI de 8, por lo que adquiere carga neta negativa conforme varía el pH de 7 a 11. Estos resultados indican que las moléculas de 43K son anfipáticas y que interaccionan entre sí y con los lípidos que las rodean.

Interacción con lípidos de membrana

El receptor nicotínico de acetilcolina, como proteína integral de membrana que es, está rodeada en su parte transmembrana por los lípidos que forman la membrana lipídica. Aunque en un principio se consideró a ésta como un mero soporte de este tipo de proteínas, debido a la influencia del modelo de membrana de mosaico fluido (Singer y Nicolson, 1972), actualmente se reconoce que las membranas lipídicas son un complejo sistema capaz de modular la actividad de las proteínas que interaccionan con ellas. Con el fin de analizar las interacciones específicas que puedan existir entre los componentes lipídicos y proteicos, tanto a nivel estructural como funcional, se han utilizado una gran variedad de aproximaciones fisicoquímicas, bioquímicas y químicas. Así, técnicas tales como el dicroísmo circular (Moore et al., 1974), resonancia magnética nuclear (Griffith et al., 1982) y espectroscopía de fluorescencia (London y Feigenson, 1981; Pink et al., 1984; González-Ros et al., 1983), han contribuido notablemente al conocimiento de las propiedades generales de las membranas biológicas. Estas técnicas pueden ser empleadas en el estudio de las interacciones lípido-proteína en el seno de una membrana biológica siempre que se disponga de una fracción de membranas altamente enriquecida en la proteína de interés o que sea posible purificar y reconstituir esta proteína en un medio lipídico conocido. A partir de los resultados obtenidos se ha concluido que los lípidos de membrana no sólo son un componente estructural de la compartimentación celular, sino que también constituyen un elemento funcionalmente importante involucrado en la modulación de algunas funciones biológicas de las proteínas de membrana. De todos modos, no se han propuesto hipótesis generales que expliquen a nivel molecular las interacciones que puedan existir entre las proteínas y los lípidos que las rodean.

Se ha caracterizado la composición lipídica de membranas ricas en AcChR, obtenidas a partir de electrocitos de *T.californica* (González-Ros et al., 1982), obteniéndose una relación lípido/proteína de 1:40 peso/peso. La relación fosfolípido/colesterol, 1:10 mol/mol, indica una extraordinaria abundancia de colesterol en estas membranas, siendo éste el principal componente de la fracción de lípidos neutros. Los fosfolípidos más abundantes en las membranas procedentes de tejido eléctrico son fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y fosfatidilserina. En menor proporción se encuentran cardiolipina, ácido fosfatídico, esfingomiélin y lisofosfatidilcolina, siendo importante señalar que los ácidos grasos integrantes son, en su mayoría, de cadena larga y de alto grado de insaturación.

En el estudio de las interacciones lípido-proteína en sistemas de membrana son de gran utilidad las técnicas de reconstitución desarrolladas, ya que permiten modificar los elementos que constituyen una membrana, posibilitando así definir el número mínimo de componentes de la misma absolutamente necesarios para realizar una

determinada función y estudiarla libre de las influencias de cualquier otro proceso de membrana. Al ser el AcChR un sistema modelo de proteína integral de membrana del que se dispone de abundante información estructural y funcional, su reconstitución en vesículas artificiales de composición definida con retención de sus características junto con el desarrollo de técnicas sensibles para medirlas, constituyen un sistema modelo para el estudio de la dependencia de parámetros estructurales y funcionales del AcChR y de las proteínas de membrana en general con las propiedades físico-químicas de la matriz lipídica que lo contiene. A su vez, este sistema nos permite el estudio de la reorganización lipídica que se produce como consecuencia de la inserción de la proteína en las vesículas lipídicas.

Los mayores avances en las técnicas de reconstitución comenzaron en 1978, cuando Epstein y Racker, seguidos de otros autores, demostraron que el AcChR podía ser solubilizado y reconstituido en vesículas lipídicas de composición definida, conservando las propiedades características del receptor como canal iónico; esto es, translocación de iones, desensibilización por agonista, etc. La introducción de las técnicas de reconstitución permiten, por tanto, la reinsertión del receptor nicotínico de acetilcolina, que previamente ha sido solubilizado con detergente y purificado, en vesículas lipídicas o bicapas planas conservando propiedades funcionales idénticas a las del receptor en su membrana nativa (McNamee y Ochoa, 1982). A lo largo de todo el proceso de reconstitución y solubilización el receptor debe ser mantenido en presencia de lípidos (Ochoa et al., 1983), lo que pone de manifiesto la importancia de los mismos en preservar la función de la proteína.

La elucidación del mecanismo molecular de actuación del receptor de acetilcolina se ha centrado en tres aspectos principales:

- 1.- La unión de ligandos específicos (agonistas, antagonistas, bloqueadores no competitivos del canal iónico, anestésicos locales, etc.).
- 2.- La activación del canal iónico mediante la unión de agonistas.
- 3.- El proceso de desensibilización por el cual la permeabilidad iónica se bloquea como consecuencia de la exposición prolongada al agonista.

Los estudios de la dependencia funcional del receptor nicotínico de acetilcolina con la matriz lipídica incluyen aspectos relativos a los tres procesos fundamentales indicados anteriormente.

Una de las aproximaciones que se ha realizado ha sido en cuanto al número de lípidos necesario para mantener el AcChR activo, que es de 45 moléculas de fosfolípido, y que corresponde con una capa de los mismos alrededor de la proteína. Si se deslipidiza más al receptor, pierde irreversiblemente su función, lo que nos permite tener una idea de la importancia de estas moléculas para el AcChR (Bhushan y McNamee, 1990). Sin embargo, son 95 moléculas de fosfolípido las que el AcChR es

capaz de afectar según medidas de DSC, que corresponderían a entre una y dos capas de fosfolípido (Bhushan y McNamee, 1990), lo que significa que la proteína no sólo afecta a los lípidos directamente en contacto con la misma.

Mediante diversos experimentos se ha comprobado que los lípidos de membrana interaccionan de forma diferenciada con el receptor nicotínico de acetilcolina, demostrándose que aquellos que tienen mayor afinidad por el receptor son también los que tienen mayores efectos sobre la función del mismo (Ellena et al., 1983). La existencia de diferencias cualitativas y cuantitativas en las propiedades de flujo iónico del receptor sugieren un papel modulador de determinados lípidos (Fong y McNamee, 1986). De modo análogo, la desensibilización del receptor nicotínico de acetilcolina que, al igual que la apertura del canal iónico implica cambios conformacionales, viene determinada por el entorno lipídico. De hecho, se ha podido comprobar que la capacidad del receptor nicotínico para sufrir transiciones entre estados de alta y baja afinidad inducidos por ligandos puede verse afectada por las propiedades dinámicas del entorno lipídico y por la composición del mismo (Lindstrom et al., 1980). Del estudio de este tipo de efectos sobre el AcChR reconstituido en matrices de diferente composición se ha concluido que el colesterol y los lípidos cargados negativamente, tales como el ácido fosfatídico, son necesarios para mantener al AcChR activo (Ochoa et al., 1983; Criado et al., 1984; Raines y Krishnan, 1998; Bhushan y McNamee, 1993). A pesar de la información existente sobre la dependencia de la función del AcChR en el entorno lipídico, no hay una explicación satisfactoria de los procesos moleculares por los que determinados lípidos ejercen tales efectos sobre la actividad de una proteína integral de membrana. Hasta ahora, se han discutido algunas hipótesis que incluyen: (i) efecto indirecto de los lípidos a través de la alteración de las propiedades físicas de la membrana, como pudiera ser la fluidez (Fong y McNamee, 1986), la curvatura de membrana y la presión lateral (Cantor, 1997; de Kruijff, 1997), grosor de la membrana (Mouritsen, 1993) o (ii) efectos directos a través de la unión de los lípidos a sitios definidos en la porción transmembrana de la proteína (Fong y McNamee, 1987; Jones y McNamee, 1988; Blanton y Wang, 1990; Fernández et al., 1993; Fernández-Ballester et al., 1994), que han llevado a postular el posible papel de ciertos lípidos como ligandos alostéricos de la proteína. La fluidez como causa única parece descartada (Sunshine y McNamee, 1992), pero hay trabajos que abogan por una mezcla de estos dos efectos. Así, Baenziger y colaboradores proponen un modelo según el cual la fluidez de la membrana determinaría el equilibrio entre los estados del AcChR de reposo y desensibilizado, de tal manera que una membrana poco fluida como sería una rica en colesterol, conllevaría un desplazamiento del equilibrio hacia la conformación de reposo y viceversa. Por el contrario, en este estudio se asigna al ácido fosfatídico (PA) una interacción directa con la proteína indispensable para que ésta

pueda ser activa (Baenziger et al., 2000). Sin embargo, hay una gran cantidad de trabajos que sí establecen una interacción directa entre el colesterol y el AcChR (Fong y McNamee, 1987; Dreger et al., 1997; Fernández-Ballester et al., 1994; Jones y McNamee, 1988; Antollini y Barrantes, 1998; A.M. Fernández et al., 1993; Leibel et al., 1987).

La razón por la que los fosfolípidos aniónicos interaccionan preferentemente con el AcChR es desconocida, aunque las fuerzas electrostáticas parecen descartadas, al menos como única causa (Raines y Miller, 1993), si bien se han propuesto sitios de interacción entre los fosfolípidos cargados negativamente y residuos cargados positivamente en los segmentos M3 y M4 de la proteína en estudios de fotomarcaje (Blanton y Wang, 1991). En cualquier caso e independientemente de las fuerzas que estén involucradas, por los estudios de EPR (resonancia paramagnética electrónica) parece que la interacción es siempre débil, produciéndose un rápido intercambio entre los fosfolípidos unidos directamente a la proteína y aquellos que estarían libres en la membrana para cualquier tipo de fosfolípido utilizado (Ellena, 1983). En cuanto a la causa por la que los fosfolípidos aniónicos son indispensables para la activación de la proteína, hay estudios que apuntan hacia una estabilización de las hélices α transmembrana (Blanton y Wang, 1991), a través de la formación de puentes de hidrógeno (Bhushan y McNamee, 1990) entre otros factores. De hecho, para el AcChR reconstituido en ácido fosfatídico, el pH del medio afecta tanto a la función como a la estructura del AcChR siempre y cuando la carga del fosfolípido varíe, aumentando la actividad y la estructura en hoja β del receptor en relación a hélice α conforme más carga negativa tenga este fosfolípido. Sin embargo, cuando se utiliza otro fosfolípido aniónico para el que el intervalo de pH no afecta a su carga, no se detecta ningún cambio (Bhushan y McNamee, 1993). Aunque el ácido fosfatídico no está en una proporción muy grande en las membranas lipídicas, su contenido es fácilmente modulable por la célula a través de la fosfolipasa D. Así, la adición de esta enzima a vesículas de AcChR en una matriz de fosfatidilcolina (PC), en las que el receptor no es activo, provoca la recuperación de la actividad de la proteína (Bhushan y McNamee, 1993), estableciéndose de este modo un mecanismo de control de la actividad del receptor y por tanto de la excitabilidad celular. Este posible esquema en el que hay un cambio de estructura secundaria como explicación del efecto de PA es contradicho en algunos trabajos mediante FT-IR de diferencia (Baenziger et al., 1999), según los cuales no habría tales cambios en estructura secundaria aunque sí algunos en la dinámica interna de la proteína.

En el caso del colesterol hay una gran controversia en cuanto a su función y sitio de acción, si bien se ha demostrado que su presencia constituye un requerimiento esencial para la correcta actividad del canal iónico asociado al receptor, así como para

las transiciones entre distintos estados de afinidad inducidas por agonistas (Criado et al., 1982; Jones et al., 1988). Los mecanismos mediante los cuales el colesterol ejerce su influencia sobre el receptor nicotínico de acetilcolina, o sobre otras proteínas de membrana, no son bien conocidos. Una posibilidad sería la de influir en la función y la estructura proteica a través de la alteración de las propiedades físicas de la bicapa lipídica, defendida en algunos trabajos (Baenziger et al., 2000). Con el fin de estudiar esta posibilidad se han realizado experimentos en los que se incluye el colesterol en vesículas lipídicas de composición definida. Utilizando diversas técnicas, como calorimetría diferencial de barrido y fluorescencia, se demuestra que el colesterol afecta notablemente la fluidez de membranas modelo, haciéndola más rígida cuando los lípidos están en fase líquido-cristalino y produciendo el efecto contrario en fase gel (Estep et al., 1978; Van Blitterswijk et al., 1987) con lo cual el efecto neto es el de homogeneizar las membranas, disminuyendo así la permeabilidad al agua y otras pequeñas moléculas (Houslay y Stanley, 1982). De hecho, utilizando concentraciones crecientes de colesterol se produce una disminución en el cambio de entalpía característico de la transición de fases, hasta quedar eliminada. Además, estudios a nivel molecular, utilizando técnicas de resonancia magnética nuclear con lípidos deuterados, demuestran la existencia de una interacción directa del colesterol con los lípidos de membrana (Dufourc et al., 1984).

La otra posibilidad que explique la necesidad del colesterol para la estabilización funcional y estructural de la proteína sería la existencia de una interacción más directa con la propia proteína de membrana. Con el objeto de analizar esta segunda alternativa se han realizado experimentos en membranas que contienen proteínas, observándose que la presencia del colesterol produce alteraciones en las mismas tanto a nivel funcional como estructural (Whetton et al., 1983; Whetton y Houslay, 1983). Así se ha evidenciado la necesidad de colesterol para mantener los cambios conformacionales del receptor nicotínico de acetilcolina inducidos por agonistas (Criado et al., 1982). Por otra parte, la estabilización estructural del receptor nicotínico de acetilcolina por colesterol (Browning y Nelson, 1976) se ha demostrado en experimentos en los que se utilizan técnicas de inactivación por calor de sitios de unión de α -bungarotoxina en el receptor nicotínico; con esta técnica se observa un desplazamiento en los perfiles de inactivación hacia temperaturas mayores conforme se aumenta el porcentaje de colesterol añadido a las membranas, indicando un claro efecto estabilizador de la estructura del receptor. Con el fin de descartar la posibilidad de que esta estabilización sea debida a la alteración de la fluidez de la membrana más que a la propia interacción del colesterol con la proteína, se ha estudiado el efecto de anestésicos locales con probada capacidad para perturbar la fluidez de la membrana (Artigues et al.; 1989), observándose que estos compuestos son incapaces de modificar los perfiles de

inactivación por calor de sitios de unión de α -bungarotoxina en el receptor nicotínico. Estudios complementarios con espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier sugieren un aumento del porcentaje de segmentos α -hélice transmembrana en el receptor (Bhushan y McNamee, 1990) cuando se emplean concentraciones crecientes de colesterol. Estas hélices α podrían estar implicadas en la formación del canal iónico asociado al receptor por lo que la estabilización de las mismas por el colesterol explicaría la necesidad de este lípido en el mantenimiento funcional de la proteína (Fong y McNamee, 1987). En posteriores estudios se ha encontrado una estabilización de estructura en hojas β (Fernández-Ballester et al., 1994) a parte de las ya mencionadas hélices α , mientras que otros postulan que el colesterol simplemente podría introducirse en los intersticios que hay entre las subunidades facilitando el deslizamiento de unas sobre las otras y posibilitando de este modo los cambios conformacionales necesarios para mantener la actividad del mismo (Corbin et al., 1998), si bien este lípido no parece necesario para la desensibilización (Fernández-Ballester et al., 1994). También se le asigna un papel importante en la inserción de proteínas de membrana en general (Scotto y Zakim, 1986). Se han llegado a diferenciar dos tipos de colesterol, aquel que estaría libre en la membrana y que sería fácilmente eliminado de la misma sin afectar a la función de la proteína, y aquel que interactuaría directamente con el AcChR y que estaría fuertemente unido, tratándose, en una primera estimación, de unos 36 por molécula de receptor (Leibel et al., 1987). En experimentos de marcaje también se ha detectado colesterol unido directamente al receptor, aunque en algunos de ellos este marcaje ha sido afectado por los cambios conformacionales de la proteína (Fernández et al., 1993; Narayanaswami et al., 1993), lo cual apoyaría la influencia de estos lípidos en la función del AcChR, y en otros no (Corbin et al., 1998; Blanton y Wong, 1991).

El esquema básicamente aceptado de la interacción de fosfolípidos y colesterol con el AcChR sería el propuesto por Jones y McNamee basados en experimentos de apagamiento de fluorescencia, según los cuales existirían dos tipos de sitios de interacción entre los lípidos y esta proteína denominados anulares y no anulares. Los primeros estarían ocupados por los fosfolípidos y los segundos en un número de 5 ó 10 por el colesterol, situándose éstos en zonas intersticiales de la proteína, ocupando los huecos que quedarían entre las diferentes subunidades y segmentos transmembrana del AcChR, **figura 11** (Jones y McNamee, 1988). Otros experimentos han confirmado este modelo (Antollini y Barrantes, 1998), e incluso se ha llegado a refinar aún más con la subdivisión de los sitios no anulares en perianulares, que estarían en contacto con la bicapa lipídica, e intersticiales, situados en lugares menos accesibles de la proteína (Addona, et al., 1998). Además, se ha propuesto un sitio extramembrana en el AcChR para el colesterol (Dreger et al., 1997), si bien es más razonable pensar que lo que pudiera ocurrir es una interacción indirecta entre ambos. Algunos trabajos indican que

podrían existir pequeñas diferencias entre las propiedades físicas de los fosfolípidos anulares y el resto como en la polaridad o en una menor penetración de agua en los mismos, si bien no se han detectado dos fases lipídicas diferentes (Antollini et al., 1996).

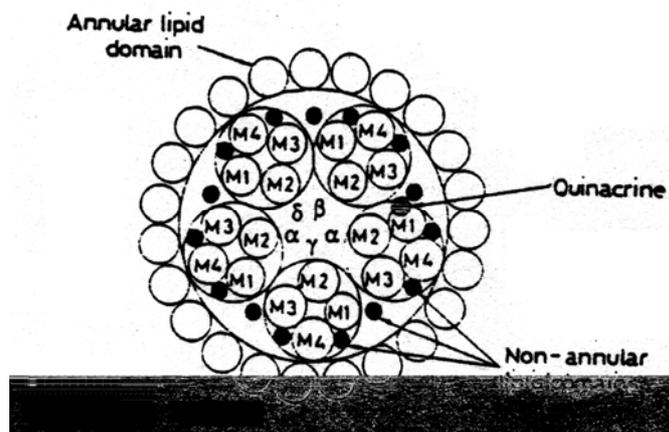


Figura 11. Sitios anulares y no anulares en el AcChR. Representación esquemática de una sección del AcChR en la interfase lípido-agua, vista desde la hendidura sináptica. El perímetro de la proteína está rodeado de ~45 moléculas de lípido, es decir, el dominio de lípidos anulares. Los 23 círculos vacíos alrededor del AcChR representan las cabezas polares de los fosfolípidos en la hemicapa extracelular de la bicapa lipídica. Los círculos pequeños negros entre las subunidades y entre los dominios M1/M4 y M3/M4 representan la posible localización de los dominios no anulares de lípidos. También se señala la posible localización del sitio para quinacrina, localizado en el segmento α M1, cerca de la subunidad β . Figura tomada de Arias, 1998.

En este mismo sentido se ha estudiado cómo afecta el AcChR al ácido fosfatídico cuando se utiliza este lípido puro para reconstituir la proteína, viéndose que el pK del mismo disminuye 2 unidades de pH para aquellas moléculas en contacto con el receptor, con lo que habría un aumento de la carga negativa que podría facilitar aún más su interacción con la proteína (Bhushan y McNamee, 1993).

Además de los fosfolípidos y colesterol hay una gran cantidad de sustancias que parecen interactuar con el AcChR a través de la interfase lípido proteína, modulando la actividad del canal. Por ello esta interfase es considerada como un sitio de interacción de baja afinidad de inhibidores no competitivos (INC), en la que a diferencia de los de alta afinidad la estequiometría no sería de un sitio por proteína sino de múltiples sitios por proteína. Los sitios de unión de baja afinidad se han estudiados entre otros métodos, mediante resonancia paramagnética electrónica (EPR), habiéndose encontrado sustancias que interactúan con mayor o menor especificidad con estos sitios (revisiones en Arias, 1996; Arias, 1998). La localización de estos sitios se ha

estudiado también mediante experimentos de apagamiento o “quenching” de la fluorescencia del único triptófano presente en la región transmembrana de la proteína, Trp 453 de la subunidad γ , (Horváth et al., 1990). El número de estos sitios podría ser de unos 10-30 y se encontrarían en la interfase lípido-proteína. Entre estas sustancias estarían los ácidos grasos libres e insaturados, que inhiben el flujo iónico del canal asociado al AcChR (Andreasen y McNamee, 1977, 1980), lo que podría ser atribuido a la perturbación de interacciones funcionalmente importantes entre el receptor y el colesterol o los lípidos cargados negativamente, ya que parecen interactuar con los sitios anulares y no anulares del AcChR (Jones y McNamee, 1988; Arias, 1998). Los esteroides, anestésicos generales e insecticidas también modulan la función del AcChR inactivando el canal a través de su interacción con los sitios no anulares, que parecen admitir sustancias de estructura química muy diversas, por lo que se trataría de sitios farmacológicamente significativos (Lechleiter et al., 1986; Arias, 1998; Blanton et al., 1998; Bouzat y Barrantes, 1996).

De todos los resultados obtenidos hasta el momento se deduce que el entorno lipídico es fundamental para el mantenimiento y modulación estructural y/o funcional del receptor nicotínico de acetilcolina. Los lípidos de membrana posiblemente intervienen a nivel de la alteración de las propiedades dinámicas de la membrana y/o a nivel de una posible interacción directa con las proteínas que en ella se incluyen y por ello se han convertido en una interesante diana farmacológica. Además, por las razones comentadas a lo largo de todo este capítulo, el AcChR también puede servir como modelo para estudiar las interacciones lípido-proteína en general.

OBJETIVOS



A lo largo de la introducción se ha evidenciado que la comprensión de las interacciones lípido-proteína es esencial para completar el esquema de funcionamiento del receptor nicotínico de acetilcolina, que como ya se ha comentado, sirve además de modelo para el resto de los miembros de la superfamilia de canales iónicos activados por ligando (LGIC).

Por esta razón, en esta memoria se pretende estudiar cuáles son los efectos derivados de esta interacción entre el AcChR y los lípidos que le rodean y más en concreto:

- cómo afecta el AcChR a la organización de los lípidos en las vesículas en que se reconstituye, en especial a la del ácido fosfatídico (PA) y colesterol, lípidos por los que esta proteína presenta alta afinidad y que parecen importantes en la modulación de su función.
- cómo afectan los diferentes lípidos en que se reconstituye el AcChR a la estructura y función del mismo.
- la correlación entre el efecto que el AcChR realiza sobre los lípidos y el que éstos realizan sobre la proteína.
- la naturaleza y características de las interacciones lípido-proteína en este sistema.

Con los datos obtenidos de todos estos estudios se pretende proponer un esquema que explique las interacciones del AcChR con su entorno lipídico.

MATERIALES Y MÉTODOS



1.- Obtención de membranas de Torpedo enriquecidas en receptor nicotínico de acetilcolina

Las membranas enriquecidas en AcChR se obtienen a partir de ejemplares de *Torpedo marmorata* procedentes del Mediterráneo y capturados durante las estaciones de invierno y primavera, con un peso medio de 3 Kg. Los ejemplares capturados se mantienen vivos hasta su llegada al laboratorio en donde se procede a la disección del tejido eléctrico, que se congela rápidamente en nitrógeno líquido y se mantiene así hasta su utilización.

El método utilizado para el aislamiento de membranas procedentes de la electroplaca de *T. marmorata* es el descrito por Martínez-Carrión et al., 1984. En él se distinguen las siguientes etapas: una porción del tejido eléctrico (100-200 g) se descongela en tampón Tris 10 mM, pH 7.4, EDTA 5 mM, PMSF 0.5 mM, Iodoacetamida 5 mM, previamente enfriado en un baño de hielo picado. Se trocea en pequeños fragmentos (1 cm³) y se homogeneiza en el mismo tampón utilizando un Politrón (Kinematica GmbH), en tres periodos de 90 s al 70% de potencia. El homogeneizado resultante se centrifuga en rotor Beckman JA-14 a 3500 r.p.m. durante 10 minutos en centrífuga refrigerada y se filtra el sobrenadante a través de 8 capas de gasa. El filtrado se centrifuga en rotor Beckman 35 a 30000 r.p.m. durante 30 minutos en ultracentrífuga a 4 °C. El sobrenadante se descarta y el sedimento (fracción de "membranas crudas") se resuspende en tampón DB-1, compuesto por Tris 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4, a una concentración aproximada de proteína de 8-10 mg/ml y con una actividad específica de aproximadamente 1.25 nmoles de α -Bungarotoxina unida por mg de proteína, que se determina según el método descrito en el apartado 7.2.

2.- Purificación del AcChR mediante cromatografía de afinidad

La purificación del AcChR mediante cromatografía de afinidad está basada en la utilización de un gel de afinidad obtenido tras la alquilación de una matriz de agarosa por bromoacetilcolina (ver apartado 5.2). El procedimiento utilizado para la purificación del AcChR es el descrito por McNamee et al., 1982, **figura 1**. Las membranas enriquecidas en receptor nicotínico correspondientes a preparaciones de 200 g de electroplaca (membranas crudas), se diluyen hasta 2 mg/ml con tampón DB-1 (Tris 10 mM, pH 7.4, NaCl 100 mM, EDTA 0.1 mM) solubilizándose a continuación con colato sódico 1% (concentración final). La mezcla se agita suavemente durante unos 20 min a 4 °C y se ultracentrífuga durante 50 min. a 30000 r.p.m. en rotor Beckman 35. El sobrenadante resultante se aplica a una columna de cromatografía de afinidad (23 x 2.5 cm)

rellena con 25 ml de Affigel 10 (Bio-Rad), derivatizada como se describe en el apartado 5.2, y previamente equilibrada con 200 ml de tampón DB-2 (DB-1 + 1% colato), manteniendo un flujo constante de 1-1.5 ml/min.

Una vez aplicada la muestra, se lava la columna con 100 ml de tampón DB-3. Este tampón está compuesto por DB-2 suplementado con 1 mg/ml de lípidos de asolectina en general o de PC de huevo para experimentos de fluorescencia, ya que los primeros contienen una fracción de lípidos neutros fluorescentes que podría alterar los resultados de dichos experimentos. La elución del receptor se lleva a cabo con 50 ml de tampón DB-4 (DB-3 + 10 mM carbamilcolina), recogiendo fracciones de 2 ml. La concentración de proteína durante el lavado y la elución se monitoriza midiendo la absorbancia a 280 nm (1 U.A. corresponde aproximadamente a 0.6 mg/ml de proteína). Se obtiene un rendimiento aproximado de unos 25 mg de proteína purificada por cada 200 g de tejido, que eluye a una concentración entre 0.8-1.4 mg/ml. El AcChR así purificado presenta una actividad específica de 8 nmoles de α -bungarotoxina unidos por mg de proteína.

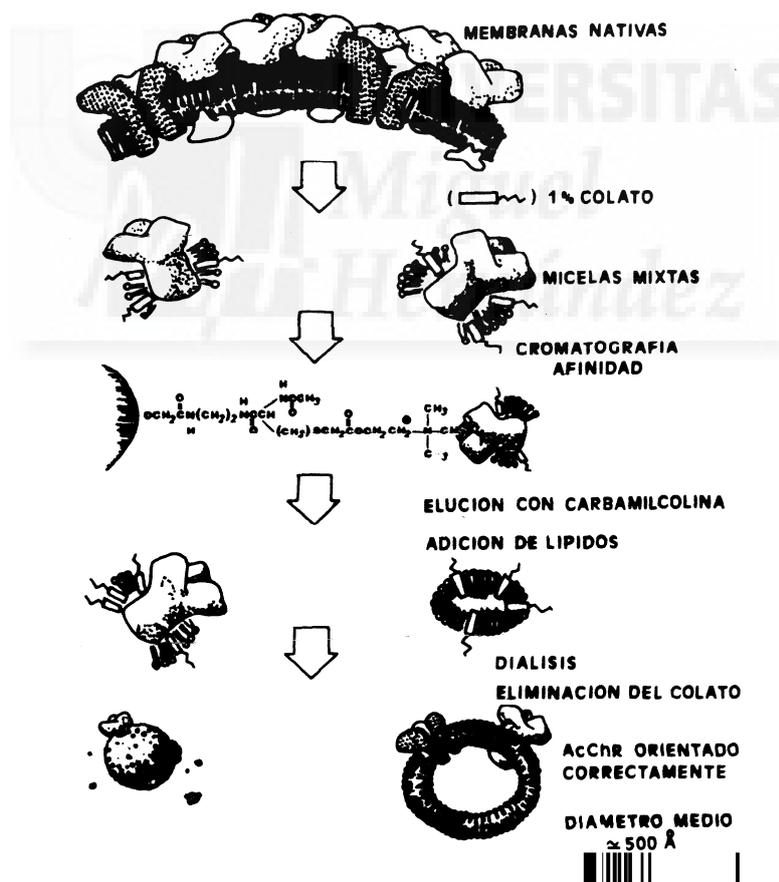


Figura 1. Esquema de la purificación y reconstitución del AcChR. Se representa la solubilización de membranas nativas con colato sódico, purificación por cromatografía de afinidad y la diálisis del detergente, obteniéndose finalmente vesículas reconstituidas. Figura tomada de McNamee et al, 1986.

En el análisis del receptor mediante electroforesis en SDS-PAGE en condiciones reductoras (apartado 4 de este capítulo), aparecen cuatro bandas muy marcadas correspondientes a las cuatro subunidades del AcChR (**figura 2**) y alguna banda muy débil probablemente de un canal de cloruro (Ivorra et al., 1996).

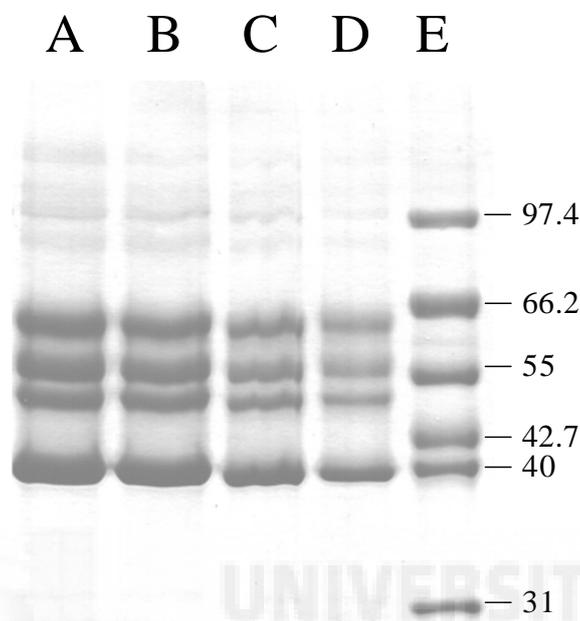


Figura 2. Electroforesis del AcChR purificado. En la figura se muestra un gel de electroforesis en SDS y condiciones reductoras cargado con AcChR purificado en las calles A (20 µg), B (15 µg), C (10 µg), D (5 µg) y patrón de pesos moleculares en la calle E. En el margen derecho de la electroforesis se indican los pesos moleculares del patrón empleado.

3.- Reconstitución del AcChR en vesículas lipídicas de composición definida

3.1.- Preparación de vesículas lipídicas

Una vez disueltos en cloroformo:metanol (2:1) los lípidos con los que se vayan a formar las vesículas, se mezclan en la proporción deseada, y se secan con una corriente de N₂, para luego someterlos a un período de alto vacío. Tras eliminar las trazas del solvente orgánico, los lípidos se hidratan en tampón Tris 10 mM, pH 7.4, NaCl 100 mM, añadiendo la cantidad necesaria del detergente CHAPS para alcanzar un 4% final. Mediante sonicación en baño, se obtiene un solubilizado transparente compuesto de micelas mixtas. Estas micelas se dializan durante 72 horas con 6 cambios de tampón, obteniéndose vesículas útiles para reconstitución (Riquelme et al., 1990), que se dividen en alícuotas y se congelan a -20°C hasta su uso.

Las vesículas de diferente composición lipídica obtenidas por diálisis del

CHAPS se solubilizan con colato al 3% inmediatamente antes de la reconstitución del AcChR tal y como se describe en el siguiente apartado.

3.2.- Procedimiento de reconstitución

Se utiliza el llamado método de diálisis de detergente (Paternostre et al., 1988; Wrigglesworth et al., 1987). El AcChR solubilizado eluido de la columna de afinidad se suplementa con las vesículas lipídicas obtenidas según el apartado anterior, previamente solubilizadas en colato al 3% final. Podemos de esta forma variar el tipo de matriz lipídica empleado en la reconstitución, así como la relación molar fosfolípido/proteína (que varía entre 3500 y 150, según los requerimientos del experimento). Estas mezclas solubilizadas de lípido y proteína se dializan extensivamente frente a Tris 10 mM, pH 7.4, NaCl 100 mM durante 72 h, con 6 cambios de tampón. Las vesículas resultantes son unilamelares y con los sitios de unión de α -Bgt orientados en más de un 90% hacia el medio extravesicular (Jones et al., 1987). Tras este proceso, se alicuotan las muestras y se congelan en nitrógeno líquido hasta su uso.

4.- Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS)

Las muestras que contienen AcChR se analizan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras y con dodecil sulfato sódico (SDS) como agente solubilizante, según la técnica descrita por Laemmli (1970). La electroforesis se realiza en geles de 7 x 10 cm con un espesor de 0.75 mm. El gel separador se prepara a una concentración de acrilamida del 7.5% y el gel concentrador del 4%. La polimerización se lleva a cabo a temperatura ambiente y los geles se dejan reposar un mínimo de 8 h antes de su utilización.

Las muestras se desnaturalizaron diluyéndolas 1:1 (v:v) con tampón Tris 120 mM pH 6.3, glicerol 10%, SDS 6%, β -mercaptoetanol 15%, azul de bromofenol 0.005% (como marcador del frente de migración). La mezcla así preparada se deja a temperatura ambiente durante 15 minutos y a continuación se aplica una alícuota de 10-30 μ l (5-15 μ g) en cada pocillo del gel.

El tampón de electroforesis es Tris 25 mM, pH 8.3, glicina 190 mM y SDS 0.1%. La electroforesis se comienza a 50 voltios hasta que la muestra penetra en el gel separador, entonces se eleva el voltaje a 150 voltios.

Los geles se tiñen durante 1 hora con una solución que contiene 0.25 g del colorante Coomassie Brilliant Blue (R-250), disueltos en 125 ml de isopropanol, 50 ml de ácido acético glacial y 325 ml de agua. Para desteñir el gel, se lavó varias veces con ácido acético al 7.5%.

5.- Preparación de la columna de Afinidad

Para purificar el AcChR, se utiliza una cromatografía de afinidad mediante un gel derivatizado con bromoacetilcolina. Para ello, se realizan los siguientes pasos.

5.1.- Síntesis de bromuro de bromoacetilcolina

La bromoacetilcolina se obtiene a partir de bromuro de colina y de bromuro de bromoacetilo. Para ello, 0.1 moles de bromuro de bromoacetilo ($d=2.32$ g/ml) se depositan en una bureta y se deja caer gota a gota sobre el bromuro de colina previamente pulverizado, agitando suavemente. La mezcla viscosa así obtenida se coloca en un baño de hielo con agitación durante 120-180 min. A continuación se añaden lentamente 50 ml de etanol absoluto para permitir la cristalización del bromuro de bromoacetilcolina. Una vez cristalizado se transfiere a un embudo de placa filtrante donde se continúa el lavado con etanol hasta que desaparece el color amarillo del producto de reacción. A continuación se seca a vacío y el precipitado se separa en alícuotas guardándose con desecante a -20°C . El bromuro de bromoacetilcolina se va a utilizar en la alquilación de los grupos sulfhidrilo presentes en la matriz de Affigel-10 que se describe en el apartado 5.2.

5.2.- Derivatización del Affigel 10

El primer paso para la derivatización del Affigel 10 es incorporar grupos tioles al mismo. Para ello, 25 ml del Affigel 10, a los que se ha eliminado el conservante, mediante una serie de lavados en un embudo de placa filtrante, se equilibran con 50 ml de Tris 20 mM pH 7.4. y posteriormente con 50 ml de cistamina 54 mM, 20 mM Tris pH 7.4, dejándolo reaccionar durante 1 hora. A continuación se lava el exceso de cistamina con 200 ml de agua y se añaden 50 ml de 20 mM DTT, 100 mM Tris pH 8, incubando durante 20 min. El agente reductor ditioneitol (DTT) rompe los puentes disulfuro del gel, originando así los grupos tioles libres cuya presencia puede constatarse mediante reacción con ditionitrobenzoato (DTNB) (apartado 5.3.) que da lugar a un intenso color amarillo. Seguidamente se lava el DTT con 100 ml de agua y se equilibra con 50 ml de fosfato sódico 50 mM, pH 7, NaCl 100 mM. Se añaden entonces 300-400 mg de bromuro de bromoacetilcolina en polvo y se agita inmediatamente, dejando reaccionar durante 30 min con agitación ocasional. Pasado este tiempo se lava el gel con 200 ml de agua y se determinan de nuevo los grupos tioles. Se obtiene un color débilmente amarillo, que indica que la mayoría de los grupos tioles han reaccionado con el bromuro de bromoacetilcolina. Los restantes grupos tioles libres se bloquean por acetilación con 50 mg de iodoacetamida. El Affigel así derivatizado se empaqueta en una columna Econo Bio-Rad 1.5 x 20 cm y se guarda a 4°C , baja fuerza iónica y bajo pH (tampón acetato amónico 0.01 M pH 4). Al aplicar los extractos

solubilizados de membranas crudas a la columna, el AcChR quedará unido a la acetilcolina por afinidad. La disociación del receptor de la matriz cromatográfica se lleva a cabo mediante elución con disolución de carbamilcolina tal como se describe en el apartado 2.

5.3.- Determinación de grupos tioles

Se utiliza la reacción con DTNB, que forma un compuesto de color amarillo en presencia de grupos tioles. A 0.33 ml de una solución de DTNB 10 mM en tampón Tris 100 mM pH 8, se añaden 10 ml del mismo tampón. Se hace reaccionar 1 ml de la disolución anterior con 50 μ l del gel derivatizado. Este ensayo se utiliza con fines puramente cualitativos.

6.- Purificación de α -bungarotoxina a partir del veneno de la serpiente *Bungarus multicinctus*

6.1.- Cromatografía de intercambio iónico y filtración

La obtención de α -bungarotoxina a partir del veneno de la serpiente *Bungarus multicinctus*, se realiza mediante el procedimiento descrito por Mebs et al., 1972, consistente en cuatro etapas de cromatografía utilizando como material de partida veneno liofilizado.

a. Cromatografía de intercambio iónico. Se utiliza el intercambiador de cationes CM-Sephadex C-25 (tamaño de partícula 40-120 μ m). La matriz cromatográfica se hidrata en agua durante al menos 48 horas y se empaqueta en columna de vidrio 40 x 1.5 cm, dejándolo equilibrar con el tampón de partida (acetato amónico 0.05 M, pH 5.8). Se disuelven 200 mg de veneno liofilizado en 2 ml de tampón acetato amónico 0.05 M, pH 5.8 y se colocan sobre la columna de intercambio iónico. La elución se lleva a cabo utilizando un gradiente de fuerza iónica y pH. El primer recipiente, que contiene 500 ml de acetato amónico 0.05 M, pH 5.4, se conecta mediante un puente salino a un segundo recipiente que contiene 500 ml de acetato amónico 0.5 M, pH 7. En el primer recipiente se instala un agitador magnético para permitir la mezcla adecuada de los dos tampones y obtener así un gradiente lineal continuo. La elución comienza cuando se conecta el primer recipiente a la columna, y ésta al colector de fracciones. El flujo se mantiene a 30 ml/h, recogiendo fracciones de aproximadamente 7 ml. La elución de la proteína se monitoriza midiendo la absorbancia a 280 nm. Los tubos correspondientes a la fracción de α -bungarotoxina (proteína mayoritaria) se unen y se concentran mediante liofilización.

b. Cromatografía de filtración en gel. Para eliminar todas las sales de la

etapa de intercambio iónico se realiza un desalado mediante cromatografía de filtración. Esto se consigue con un gel Sephadex G-25 (grano medio), que se equilibra en agua durante 12 horas y se empaqueta en una columna de 40 x 2.5 cm. La muestra anterior se disuelve en 10 ml de agua, se aplica a la columna y se eluye con agua. La medida de absorbancia a 280 nm reveló un pico mayoritario de toxina, que se concentró de nuevo mediante liofilización.

c. Cromatografía de intercambio iónico. La muestra desalada y disuelta en acetato amónico 0.05 M, pH 5.8, se aplica a una nueva columna de intercambio iónico de las mismas características que la del apartado **a**, sustituyendo el tampón final por acetato amónico 0.3 M, pH 7. Las fracciones con mayores valores de absorbancia a 280 nm se liofilizan y se resuspenden en 10 ml de agua para el siguiente desalado.

d. Cromatografía de filtración en gel. Se elimina de la muestra el acetato amónico de forma similar a la anterior cromatografía de exclusión. La α -bungarotoxina disuelta en agua se liofiliza y se guarda a -20°C hasta su uso.

6.2.- Cromatografía líquida de alta resolución

Un proceso alternativo de purificación de α -Bgt exenta de fosfolipasa A_2 es el descrito en Ferragut et al., 1984. La muestra obtenida en la primera cromatografía de intercambio iónico por columna, se puede purificar directamente sometiéndola a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para ello, la fracción de α -Bgt obtenida en la cromatografía de intercambio iónico (apartado 6.1.a), se dializa frente a agua durante 35 h. con tres cambios, utilizando bolsas de diálisis que tienen un límite de exclusión de 3000 Daltons.

La α -Bgt dializada se aplica en una columna de intercambio iónico CM60 (6 mm x 15 cm, IEX535CM, ALTEX) previamente equilibrada con tampón acetato amónico 150 mM, pH 5, y se eluye con un gradiente lineal de acetato amónico 150 mM, pH 5, a acetato amónico 500 mM, pH 7, con un flujo de 1 ml/min y con una duración de 45 minutos. Los cambios de absorbancia se monitorizan a 280 nm con un detector Beckman 163 acoplado a un registrador Spectra- Physics 4290. En estas condiciones, el tiempo de retención para la α -Bgt es de 16 minutos aproximadamente. Se recoge la fracción de α -Bgt y se dializa frente a agua durante 24 h. A continuación se liofiliza y se resuspende en una solución acuosa conteniendo azida sódica al 0.02%. La concentración de la α -Bgt se determina midiendo la absorbancia a 280 nm (1 mg/ml= 0.6 unidades de absorbancia).

Todos los reactivos utilizados en la cromatografía líquida de alta resolución se desgasifican y se filtran previamente, a través de un filtro Millipore de 0.45 μm .

7.- Estudios de unión ^{125}I - α -bungarotoxina al AcChR

7.1.- Cromatografía de intercambio iónico de ^{125}I - α -bungarotoxina

Con el fin de eliminar la BSA presente en la ^{125}I - α -Bungarotoxina comercial, se realiza una cromatografía de intercambio iónico. Se pesa 1 g de DEAE-Sephadex y se equilibra en agua durante 4 horas, se empaqueta en una columna de 11 ml de capacidad total, rellenándose con el Sephadex hasta 8 ml. La columna se equilibra con 4 volúmenes de agua y azida sódica al 0.02%.

La ^{125}I - α -Bgt comercial (250 μCi) se resuspende en 1 ml de agua y azida sódica al 0.02%, 0.5 ml se aplican a la columna y se eluyen con una solución acuosa conteniendo azida sódica al 0.02%, recogiendo alícuotas de 0.5 ml aproximadamente. La elución de ^{125}I - α -Bgt se monitoriza realizando el conteo de las fracciones recogidas en un contador gamma (WILJ). Las fracciones que contienen radioactividad se reúnen y su concentración se determina midiendo su absorbancia a 280 nm. La ^{125}I - α -Bgt se lleva a la concentración requerida para los estudios de unión al AcChR mediante la adición de α -Bgt no radioactiva.

7.2.- Determinación del número de sitios de unión de α -bungarotoxina al AcChR

La α -Bgt es capaz de unirse específicamente al AcChR con una alta afinidad ($K_D = 10^{-11}$ M). La incubación del AcChR solubilizado en presencia de un exceso de ^{125}I - α -Bgt durante 30-60 minutos a temperatura ambiente, permite la formación de complejos AcChR- ^{125}I - α -Bgt, fácilmente separables de la ^{125}I - α -Bgt libre, tal y como se describe a continuación. De esta forma es posible determinar el número de sitios de unión de α -Bgt presentes en muestras con distinto grado de purificación del AcChR, empleando una concentración constante de ^{125}I - α -Bgt y concentraciones crecientes de AcChR solubilizado. El método que se sigue para el estudio de la unión de ^{125}I - α -Bgt a membranas enriquecidas en AcChR o a AcChR purificado y reconstituido, es el descrito por Schmidt y Raftery, 1973.

Las muestras (membranas enriquecidas en AcChR a 1 mg/ml o vesículas conteniendo receptor purificado) se solubilizaron en presencia de 1% de Tritón X-100. Distintas alícuotas de ésta preparación se llevaron a un volumen final de 100 μl con tampón Hepes 10 mM pH 7.4, NaCl 100 mM, Tritón X-100 1%, y por último se añadió a cada uno de los tubos 25 μl de una solución de ^{125}I - α -Bgt (30-40 $\mu\text{g/ml}$). Tras un periodo de incubación de 2 horas a temperatura ambiente, 100 μl de cada fracción se adsorbieron sobre un disco de papel Whatman DE 81 de 2.3 cm de diámetro, de forma que el complejo ^{125}I - α -Bgt-AcChR queda retenido en el intercambiador iónico. Con

objeto de eliminar la ^{125}I - α -Bgt libre se realizaron tres lavados de 10 minutos con tampón fosfato 10 mM pH 7.4, NaCl 0.05 M, Tritón X-100 0.1%, NaN_3 0.02%, en una proporción de 500 ml de tampón para cada 30 discos de papel. Finalmente, los discos se dejaron secar y se colocaron en tubos para determinar su radioactividad en un contador gamma Beckman 5500. Mediante la representación de la radioactividad obtenida frente a la concentración de AcChR, se obtiene una curva de saturación a partir de la cual, es posible determinar el número de lugares de unión presentes en el AcChR tomando como referencia la cantidad máxima de α -Bgt unida al AcChR (obtenida de la zona de saturación de la curva). Teniendo en cuenta que por cada mol de AcChR se unen dos moles de α -Bgt, el valor máximo teórico de los sitios de unión de α -Bgt en una preparación de AcChR purificado es de aproximadamente 64 μg de α -Bgt por mg de proteína total (8 nmoles de α -Bgt por mg de AcChR).

8.- Obtención del AcChR en forma monomérica

El AcChR reconstituido en vesículas lipídicas se incubó con DTT 5mM durante 1 hora a temperatura ambiente y oscuridad. Luego se ultracentrifugó la muestra durante 1 hora a 55.000 r.p.m. en rotor Beckman Ti 70 a 4 °C, resuspendiéndose el sedimento, tras descartar el sobrenadante, en tampón Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4. Con el fin de eliminar completamente el agente reductor, la muestra se dializa frente a este mismo tampón durante 12 horas, con dos cambios de tampón.

9.- Proteólisis del AcChR

Se siguió un protocolo similar al utilizado por Görne-Tschelnokow et al., 1994. El AcChR reconstituido en vesículas lipídicas a una concentración de proteína de 1mg/ml en Tris 10 mM, NaCl 100 mM, $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ 1% (p/v), pH 8, se incubó durante 3 horas a 37 °C con proteinasa K a 1mg/ml. Luego se adiciona PMSF 0.2 mM para finalizar la reacción de proteólisis. Tras ello, la muestra se centrifugó 30 minutos a 55000 r.p.m. en rotor Beckman Ti 70, añadiéndose a continuación tampón Tris 10 mM, NaCl 0.5 M, pH 7.4 y se agita la mezcla durante 1 hora en hielo. Este ciclo de centrifugación y resuspensión se repite dos veces pero añadiendo agua en vez del tampón y con incubaciones de 15 minutos en hielo. Por último, se resuspende el pellet de la última centrifugación en tampón Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4.

10.- *Determinación de la concentración de fosfolípidos*

Se utilizó el método de descrito por Bötcher et al., 1961, en el que se determina la cantidad total de fosfato de la muestra. En este caso, se trata de muestras en las que dicho grupo químico sólo puede provenir de los fosfolípidos, por lo que nos es útil para su determinación. Las disoluciones empleadas fueron:

- Solución patrón de fósforo, KH_2PO_4 0.4 mM.
- HClO_4 , 60 %.
- Ácido ascórbico 10%.
- Reactivo de molibdato. Se preparó disolviendo 2.5 g de molibdato amónico tetrahidratado en 14.3 ml de ácido sulfúrico concentrado y diluyendo a 1 litro con agua bidestilada.

Se tomaron alícuotas de 50, 100, 150, 200, 250 y 400 μl de la solución patrón y los diferentes problemas por duplicado y se llevaron a un volumen final de 400 μl con agua destilada. Seguidamente se añadió a todos los tubos 400 μl de HClO_4 60 %; se taparon con una bola de vidrio y se mantuvieron a 180°C durante 90 min. en baño de arena. Se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente, añadiéndose a continuación 4 ml de reactivo de molibdato y posteriormente 0.5 ml de ácido ascórbico al 10%, al mismo tiempo que se agitan los tubos. Tras ello, se incuban las muestras en un baño con agua hirviendo durante 10 minutos. Se dejan enfriar y se mide la absorbancia a 812 nm.

Para calcular la cantidad de fosfato en la muestra problema, se interpola la recta de calibrado obtenida con los patrones.

11.- *Cuantificación de proteínas*

La concentración de proteína en las muestras se determinó según el método descrito por Lowry et al., 1951. Los reactivos usados en esta determinación fueron los siguientes:

Reactivo A: sulfato de cobre (II) pentahidratado al 1%.

Reactivo B: tartrato sódico potásico al 2.3%.

Reactivo C: carbonato sódico (30 g/l) en hidróxido sódico 0.1 N.

Reactivo D: 1.0 ml de A + 1.0 ml de B + 98 ml de C.

Reactivo E: reactivo de Folin-Ciocalteau diluido 1:1 con agua destilada.

Solución patrón: albúmina de suero bovino (BSA), 1 mg/ml en el tampón en que se encuentre la muestra.

La curva patrón se obtuvo con alícuotas de 5, 10, 25, 50, 75 y 100 μl de la

disolución de BSA. De la muestra problema se tomaron alícuotas por duplicado de 10, 25, 50, 75 y 100 μl .

El procedimiento seguido fue el siguiente: las alícuotas de BSA y de las muestras, previamente solubilizadas con Tritón X-100 al 1% en el caso de no estar ya solubilizadas en algún otro detergente, se llevaron a 250 μl con tampón. Este tampón tendrá la misma composición que el de las muestras y BSA, incluido el detergente. Seguidamente se añaden 2.5 ml de reactivo D y se agita. Después de 10 minutos se añaden 250 μl de reactivo E. Transcurridos 30 minutos, se mide la absorbancia a 650 nm, determinándose la concentración de proteína por interpolación con los valores de absorbancia obtenidos de la recta patrón.

12.- Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier

Para el estudio mediante FTIR, algunas muestras fueron sometidas a un intercambio de H_2O por D_2O mediante un ciclo de centrifugación y resuspensión en el tampón en el que estaba la muestra, pero en este caso en D_2O . Para ello, se contaba con un stock de tampones liofilizados. Tras ese intercambio, se vuelve a centrifugar la muestra, resuspendiendo finalmente el pellet en 25 μl , quedando las muestras a una concentración de 15-20 mg de proteína/ml. Se utiliza D_2O en los tampones para eliminar la interferencia de la absorbancia del H_2O (Mendelsohn y Mantsch, 1986; ver “*Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier*” en Apéndice). Las soluciones resultantes se depositan sobre una de las ventanas de CaF_2 . A continuación se coloca un separador de teflón de 50 μm y finalmente la segunda ventana. Todo ello se acopla en una cámara desmontable (Harrick, Ossining, NY) que se ajusta a un sistema de lanzadera, el cual permite obtener el espectro del fondo y de la muestra con el simple movimiento de la cámara. La muestra se mantiene termostatzada durante 3 horas a 21 $^\circ\text{C}$ con ayuda de un baño circulante. Durante este tiempo se asegura que el intercambio isotópico H-D del protón amídico llegue a una situación de equilibrio, lo que ocurre cuando se consigue una absorbancia mínima constante en la banda amida II (1550 cm^{-1}).

Para estudios de la región del espectro entre 1500-950 cm^{-1} , que contiene bandas de absorbancia asignadas a vibraciones de los ésteres de fosfato del ácido fosfatídico, se emplearon ventanas de ZnS e igualmente un separador de teflón de 50 μm . Las muestras se prepararon como se describe más arriba aunque utilizando un tampón acuoso.

Los espectros se adquirieron en un espectrómetro Nicolet 520 equipado con un detector DTGS (Castresana et al., 1992). Los espectros tomados para estudiar la banda amida I resultaron de promediar 200 barridos, mientras que aquellos en los que se estudiaba las bandas de los ésteres de fosfato del ácido fosfatídico se adquirían 600

barridos. En ocasiones se ha tomado una serie de 15 espectros durante un proceso de aumento escalonado de la temperatura, a intervalos de 5 °C, experimentando la muestra un incremento de temperatura de 23 a 70 °C en un tiempo de 195 minutos. Transcurridos 30 minutos, la temperatura descendió de nuevo a los 23 °C iniciales y se adquirió otro espectro que permitiera estudiar si los cambios inducidos por el aumento de la temperatura eran o no reversibles. Tanto en el experimento en que se adquirió un solo espectro como en el que se tomaba la serie de 16 espectros, el “software” que permitía su adquisición promedió los barridos, realizó su apodización utilizando la función de Happ-Genzel y finalmente aplicó la transformada de Fourier, dando una resolución de 2 cm⁻¹. Cuando fue necesario se utilizaron los procedimientos habituales de estrechamiento de banda, empleándose en la derivada un orden de 3 y un valor de 0.3 como punto de corte (Mantsch et al., 1988; Moffatt y Mantsch, 1992). La desconvolución se calculó utilizando una anchura de banda lorentziana de 12 cm⁻¹, con un factor de aumento de resolución de 1.8-2 y la apodización de Bessel (ver “*Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier*” en Apéndice).

El valor del pH se corrigió utilizando la función $pD=pH+0.4$ (Gregory y Roseberg, 1986).

13.- Calorimetría Diferencial de Barrido

Los estudios realizados con esta técnica (ver “*Calorimetría diferencial de barrido*” en Apéndice) se llevaron a cabo con vesículas lipídicas con y sin AcChR. A tal efecto, se centrifuga la muestra de interés a 55.000 r.p.m. en rotor Beckman Ti-70 durante 30 minutos, y se resuspende en el tampón adecuado a un volumen de 1.4 ml para llenar totalmente las celdas del equipo. La concentración final de fosfolípido sintético, es decir, aquel que puede dar lugar a una transición de fase, en todas las muestras pasadas por el calorímetro es de 10 mM.

Los termogramas fueron adquiridos en un calorímetro diferencial de barrido Microcal MC-2, equipado con una interfase digital DA-2 y una utilidad para la adquisición automática de los datos (Villar et al., 1988). Cada muestra y su tampón correspondiente fueron equilibrados térmicamente en el calorímetro a una temperatura 4 °C inferior a la del inicio del termograma durante 45 minutos, antes de iniciar el calentamiento. La velocidad de barrido empleada fue de 45 °C/h. El volumen de la celda para la muestra y referencia es de 1.3 ml. La temperatura de transición es aquella en la que se detecta una capacidad diferencial de calor máxima, observada en los termogramas originales y sin ninguna corrección de línea de base. La entalpía se calculó del área del termograma obtenido, una vez restada la línea de base, y normalizado el espectro a la concentración del fosfolípido que da lugar a la endoterma presente en la muestra.

14.- Adición de sondas fluorescentes

De una disolución stock se añade el volumen correspondiente de cada una de las sondas fluorescentes a la suspensión de proteoliposomas y se deja estabilizar durante unos minutos antes de realizar las medidas de fluorescencia. En el caso del ácido trans-parinárico (*t*-PnA), debido a su sensibilidad al aire, la mezcla fue burbujeada con Argón e inmediatamente sellada. En algunos casos la mezcla fue incubada a 55 °C (DPH) o a temperatura ambiente (Laurdan) durante una hora antes de su uso, con el fin de asegurar una completa incorporación de la sonda a los proteoliposomas. El dehidroergosterol (DHE) y el β -DPH HPA fueron añadidos de manera intrínseca, es decir, mezclados con los lípidos en el primer paso de la formación de vesículas lipídicas (ver apartado 3.1), cuando todos los componentes lipídicos están en la mezcla orgánica. En ciertas ocasiones, la sonda β -DPH HPA se añade por inyección en etanol con jeringa Hamilton mientras se agita vigorosamente la muestra, incubando la mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente. En estos casos se dice que la adición de la sonda es extrínseca. En cualquier caso la relación molar de la sonda respecto al lípidos de las vesículas nunca es mayor que el 3%. Asimismo, el porcentaje de solvente en el que se añade la sonda en la muestra tampoco es superior al 2% (v/v). En la **figura 3**, se muestran las estructuras de todas las sondas utilizadas.

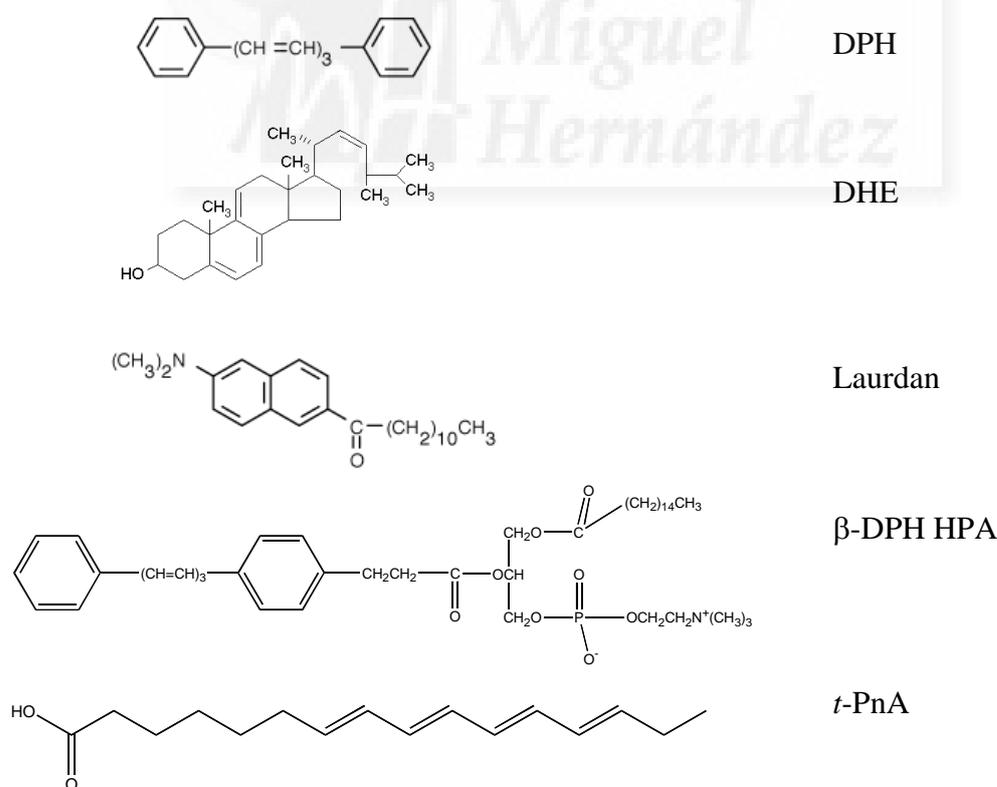


Figura 3. Estructura de las sondas fluorescentes. 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH); dehidroergosterol (DHE); 6-dodecanoil-2-dimetilaminonaftaleno (Laurdan); 2-(3-(difenilhexatrienil) propanoil)-1-hexadecanoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (β -DPH HPA); ácido trans-parinárico (*t*-PnA).

15.- Medidas espectroscópicas

Los espectros de absorción se llevaron a cabo usando un espectrofotómetro BECKMAN a temperatura ambiente. Los espectros de fluorescencia, la transferencia de energía por resonancia y las medidas de anisotropía en estado estacionario se tomaron en un fluorímetro SLM-8000C termostatzado por medio de un baño. Este equipo consta de una lámpara de Xenón de 450 W, un monocromador de excitación de doble rendija, portacubetas de cuatro posiciones, un monocromador de emisión de doble rendija, y una unidad central o CPU. Además está conectado a un ordenador con el software adecuado para adquisición y tratamiento de datos. El aparato admite la posibilidad de utilizar polarizadores y de trabajar en formato “L” ó “T”, al contar con dos canales de medida. Existe un tercer canal que servirá como referencia interna para corregir las variaciones de intensidad de la lámpara.

Los espectros de excitación de fluorescencia se tomaron siempre usando la referencia interna, en este caso rodamina, para corregir posibles variaciones en la intensidad de la lámpara. Asimismo, los espectros de emisión fueron corregidos con el software que incorpora el propio equipo. En cualquier caso, siempre se restó el espectro del blanco correspondiente al de la muestra de interés.

La anisotropía de fluorescencia en estado estacionario $\langle r \rangle$, definida por la relación (Lackowicz, 1983, 1999),

$$r = (I_{VV} - GI_{VH}) / (I_{VV} + 2GI_{VH})$$

se obtiene midiendo la componente perpendicular y paralela de la emisión de fluorescencia con la luz de excitación polarizada verticalmente. El factor G ($G = I_{HV}/I_{HH}$) corrige las distorsiones en la transmisividad introducidas por el sistema de detección (ver “Anisotropía de Fluorescencia” en Apéndice). Estas medidas de anisotropía se hicieron con polarizadores Glan-Thompson, y las intensidades de fondo debido a las vesículas lipídicas siempre se restaron de las correspondientes muestras.

Las medidas de anisotropía de fluorescencia están afectadas por la dispersión de la luz que provoca la muestra. En preparaciones en las que hay membranas lipídicas se hace necesario hacer correcciones de los valores medidos directamente en el instrumento, ya que la dispersión de la luz disminuye el valor de la anisotropía de la muestra. Estas correcciones se realizan aplicando la ecuación dada por Teale (Teale, 1969):

$$r_{obs} = r' - K(OD)r'$$

donde r_{obs} es la anisotropía observada, r' es la anisotropía extrapolada a

densidad óptica (OD) cero, y K es la constante de proporcionalidad observada.

Para realizar esta corrección, primero hay que calcular el parámetro K para cada tipo de muestra, ya que el valor de este parámetro varía según la estructura, composición y preparación de la muestra (Lentz et al, 1979). El cálculo se realiza midiendo la anisotropía de fluorescencia y la densidad óptica de la muestra a diferentes diluciones, representando a continuación los valores de r_{obs} frente a los de OD, y ajustando los datos a una recta, de la que se obtiene a partir de la pendiente y ordenada en el origen el valor de K. La linealidad de r_{obs} frente a OD sólo se mantiene hasta una OD de 0.5-0.6, por lo que en muestras con más de esta turbidez se hace imposible corregir de forma exacta la anisotropía. Una vez obtenidos estos parámetros, para calcular la anisotropía de la muestra a dilución cero, sólo se tiene que medir el valor de OD y de r_{obs} de la muestra, y aplicar la ecuación de Teale con el valor de K anteriormente calculado.

En el caso de la sonda Laurdan, en vez de medir la anisotropía de fluorescencia, se siguió la Polarización Generalizada de excitación (exGP), parámetro introducido por Gratton y colaboradores (Parasassi et al., 1990, 1991) y que se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$exGP = (I_{434} - I_{490}) / (I_{434} + I_{490})$$

donde I_{434} e I_{490} son las intensidades de emisión a las longitudes de onda características de la fase gel (434 nm) y la fase líquido-cristalino (490 nm) respectivamente (ver “Polarización generalizada de fluorescencia” en Apéndice). Este parámetro se puede obtener a diferentes longitudes de onda (320-410 nm).

Las longitudes de onda de excitación y emisión para las sondas fueron:

Sonda	Excitación (nm)	Emisión (nm)
Triptófano	280	330
<i>t</i> -PnA	320	420
DPH	360	430
PA-DPH	360	430
DHE	324	376
Laurdan	380	434/490

16.-Transferencia de energía por resonancia (R.E.T.)

16.1.- Cálculos preliminares

Para cada par donador-aceptor de transferencia de energía se calculó en un primer paso el radio crítico de transferencia, R_0 (ver “Transferencia de energía por resonancia” en Apéndice), de acuerdo a la ecuación (Förster, 1949):

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2\Phi_D J}{128\pi^5 n^4 N_{AV}}$$

donde Φ_D es el rendimiento cuántico del donador en ausencia de aceptor, n es el índice de refracción del medio, N_{AV} es el número de Avogadro, κ^2 es el factor de orientación y J la integral de solapamiento. El valor usado para el índice de refracción del medio es de 1.33 y el de κ^2 es 2/3 (Valenzuela et al., 1994; Gutiérrez-Merino et al., 1995).

Esta integral (J) está determinada por el grado de solapamiento entre el espectro de emisión del donador y el espectro de absorción del aceptor, y viene definida en la siguiente ecuación:

$$J = \frac{\int f_D(\lambda)\varepsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda}{\int f_D(\lambda)d\lambda}$$

donde ε_A es el coeficiente de extinción molar del aceptor, calculado a partir del espectro de absorción del mismo, y $f_D(\lambda)$ es el espectro de emisión del donador. Para calcular esta integral, simplemente se dividen las áreas de las curvas generadas con el numerador y denominador en el intervalo de longitud de onda donde haya solapamiento entre el espectro de emisión del donador y el de absorción del aceptor.

Para obtener la curva teórica de transferencia de energía para un sistema en dos dimensiones como es el de las sondas fluorescentes embebidas en una bicapa lipídica, utilizamos el modelo de Gutiérrez-Merino (Gutiérrez-Merino et al., 1987, 1994, 1995). Este modelo ha sido desarrollado para el receptor nicotínico de acetilcolina en una bicapa lipídica, por lo que tiene en cuenta las particularidades de este sistema (ver “Análisis de los datos de Transferencia de Energía por Resonancia” en Apéndice). La aplicación del mencionado modelo se realizó mediante un programa informático escrito en lenguaje Basic modificado levemente para las condiciones particulares de estas muestras. El programa básicamente pide los valores de R_0 , que se calcula para cada par aceptor-donador como ya se ha descrito, y la relación lípido-proteína, que se controla en la reconstitución del AcChR. Después hemos de fijar los valores de H , r y K_r para los que queramos obtener las curvas teóricas de transferencia de energía. Estos parámetros

son, respectivamente, la distancia entre los planos en que se encuentran el donador y aceptor, la distancia mínima entre donador y aceptor, y la constante de disociación del aceptor por los lípidos en la región anular. Estas curvas se compararon con los valores experimentales con el fin de obtener los parámetros H , r y K_r de diferentes sondas fluorescentes o de una sonda en dos matrices lipídicas diferentes.

16.2.- Medida de la eficiencia de energía

En la determinación de los valores experimentales de eficiencias de energía, alícuotas de las sondas aceptoras, *t*-PnA (en etanol) o DPH (en dimetilformamida), fueron añadidas a una cubeta de fluorescencia que contenía una suspensión de AcChR reconstituido en vesículas lipídicas de composición controlada. La pérdida de intensidad de fluorescencia del donador, los triptófanos de la proteína, fue seguida con una excitación de 280 nm y una emisión de 330 nm, tras cada una de las adiciones de la sonda.

En los estudios de transferencia de energía en estado estacionario, hay que tener en cuenta los posibles artefactos que se producen en la medida de la intensidad del donador. En este sentido, la absorción del aceptor a la longitud de onda del donador (280 nm) fue corregida de acuerdo a la ecuación (Coutinho y Prieto, 1993),

$$I_{corr} = I_{exp} \frac{A_{tot}(1-10^{-A_d})}{A_d(1-10^{-A_{tot}})}$$

donde I_{exp} es el valor experimental obtenido, A_d y A_{tot} son las absorbancias para el donador solo y para el donador más aceptor respectivamente. La corrección por el fenómeno de reabsorción, en el que el aceptor absorbe parte de la emisión del donador, se llevó a cabo aplicando la ecuación,

$$I_{corr2} = I_{corr} \frac{2.303A_A}{1-10^{-A_A}}$$

donde A_A es ahora la absorción del aceptor a la longitud de onda de emisión del donador (330 nm.).

Una vez realizadas estas correcciones a la intensidad de fluorescencia del triptófano para cada una de las adiciones de sonda fluorescente, los valores obtenidos se utilizaron directamente para su comparación con las curvas teóricas del modelo de Gutiérrez-Merino.

Estos datos se representan en un gráfico que tiene como ordenada la eficacia de transferencia de energía, calculada a partir de la ecuación:

$$E = 1 - (I_{DA} / I_D)$$

donde E es la eficacia de transferencia de energía, I_{DA} es la intensidad de fluorescencia corregida del donador en presencia del aceptor e I_D es la intensidad de fluorescencia corregida del donador en ausencia de aceptor. En la abscisa se representa la densidad superficial de aceptor, que se calcula dividiendo la superficie que ocupa la sonda añadida entre la superficie total de lípidos accesible para la sonda. Para hacer este cálculo se han tomado las áreas de las sondas como 0.283 nm^2 (Mateo et al., 1993), las de los fosfolípidos como 0.7 nm^2 (Thomas et al., 1978) y la del colesterol como 0.38 nm^2 (Ipsen et al., 1990).

17.- Recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueo (FRAP)

Los experimentos de FRAP se realizaron en colaboración con el Dr. Eurico Melo y José Pedro Santos Jorge (Instituto de Tecnología Química e Biológica, Oeiras, Portugal). Las especificaciones técnicas del instrumento han sido anteriormente descritas (Vaz et al., 1989).

Las muestras utilizadas se mantuvieron termostalizadas mediante un baño a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos antes de realizar las medidas. Los tiempos de fotoblanqueo fueron de 10-30 ms., recogiendo las curvas de FRAP en un total de 1000 canales con un periodo mínimo de 30 ms por canal. La intensidad del haz de láser para la observación de la muestra se escogió de tal manera que no se observara fotoblanqueo durante un periodo equivalente al de una medida usual.

Las curvas generadas en los experimentos de FRAP se ajustaron usando el algoritmo Simplex a la ecuación obtenida por Soumpasis (Soumpasis, 1983). Esta ecuación describe la recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueo de una región circular uniforme y asume que las moléculas fluorescentes no fotoblanqueadas difunden libremente para atravesar todo el perímetro de la región fotoblanqueada. Los parámetros del ajuste fueron: el tiempo de recuperación, τ ; la intensidad de fluorescencia inmediatamente tras el fotoblanqueo, $F(0)$ y la intensidad de fluorescencia a tiempo infinito tras el fotoblanqueo, $F(\infty)$. La fluorescencia antes del fotoblanqueo, $F(i)$, se tomó como el valor medio de los 100 canales anteriores al pulso de fotoblanqueo. El radio del haz circular del láser, necesario para realizar el ajuste, se calculó como se describe en el siguiente apartado, 17.1.

17.1 Determinación del radio del haz circular del láser

Este cálculo se realizó utilizando como sonda fluorescente el fosfolípido NBD-DSPE en multicapas de POPC. La temperatura de muestra fue de 25 °C, para la cual está estandarizado el coeficiente de difusión, que es de $4.4 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$. Del análisis de la curva de FRAP correspondiente se obtiene un radio de 3.7 μm . Este dato se utilizará para el análisis de las curvas que se obtengan con el resto de las muestras.

17.2 Marcaje con FITC

En la preparación de las muestras para FRAP, se partió de las de AcChR reconstituido en membranas lipídicas, obtenidas como ya se ha descrito en los apartados 1,2 y 3 de este mismo capítulo. En dichas muestras se realizó un marcaje de la proteína con isotiocianato de fluoresceína (FITC) del siguiente modo: se centrifuga la muestra a 50.000 r.p.m. (250000 g) durante 30 minutos en rotor Beckman Ti-70, para luego resuspenderla en tampón $\text{NaCO}_3/\text{NaHCO}_3$, pH 9.5, a una concentración final de proteína de 2 mg/ml. A continuación se añade FITC (Molecular Probes,) a 0.25 mg/ml y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz. A fin de eliminar el FITC libre, se centrifugan las membranas a 50.000 r.p.m. en el mismo rotor, durante 30 minutos y a 4 °C, resuspendiendo la muestra en tampón Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4. Este ciclo se repite tres veces para asegurarnos que no queda nada de FITC libre. Las muestras así preparadas se fraccionan en alícuotas de 0.1 mg de AcChR y se conservan congeladas en $\text{N}_2(\text{l})$.

17.3 Preparación de multicapas lipídicas para FRAP

Para realizar experimentos de FRAP se necesitan multicapas lipídicas homogéneas y de gran superficie, en relación al radio del láser, en las cuales la sonda fluorescente pueda difundir libremente. Para la obtención de este tipo de muestras se utilizó el siguiente protocolo: se mezcla una alícuota de AcChR marcado con FITC y otra de membrana de composición controlada a fin de obtener una relación lípido/proteína de aproximadamente 150 en peso. Luego se untracentrifuga la mezcla a 50.000 r.p.m. durante 30 minutos en rotor Ti-70 de Beckman. Se resuspende la muestra en 75 μl de Tris 10 mM, pH 7.4, 5% (v/v) etilenglicol con la ayuda de una jeringa hasta homogeneidad. Se deposita la muestra en alícuotas de 3-4 gotas en un portaobjetos previamente deslipidizado con cloroformo::metanol (1:1 v/v) y se deja 3 horas en un desecador sobre cloruro de calcio anhidro a 4 °C. Tras ese periodo se añaden 50 μl de agua destilada sobre cada alícuota del portaobjetos y se deja hidratar toda la noche a 4°C en placa de Petri y en presencia de papel de filtro mojado con agua para conservar una atmósfera con una humedad relativa cercana al 100%. Pasado este tiempo se cubre

la muestra y se sella con cera para poder utilizarla en el microscopio de FRAP sin que se deshidrate.

18.- Análisis de la actividad del AcChR mediante técnicas de cinética rápida

Con objeto de medir la translocación de iones mediada por el AcChR en una escala de tiempo próxima a la fisiológica, se ha utilizado el procedimiento descrito inicialmente por Moore y Raftery, 1980, y modificado posteriormente por González-Ros et al., 1984. Se utilizan técnicas basadas en la desactivación de la fluorescencia de un fluoróforo hidrofílico (tetrasulfonato sódico de pireno, PTSA) atrapado en el interior de las vesículas. El método implica la mezcla rápida de las vesículas con el catión Tl^+ (**figura 4**), que se añade al medio extravesicular y que se pone en contacto con el fluoróforo mediante la apertura del canal iónico asociado al AcChR en presencia del agonista colinérgico carbamilcolina. Esta técnica permite el seguimiento continuo del flujo catiónico en una escala de tiempo próxima a la fisiológica. Las medidas de desactivación de fluorescencia dan información sobre la constante aparente de velocidad (K_{app}^{max}) de entrada de Tl^+ y a su vez se puede determinar la constante de disociación (K_D) y el coeficiente de Hill (n_H) para la unión del agonista (Donnelly et al., 1984; González Ros et al., 1984).

18.1.- Encapsulación de fluoróforo en vesículas con AcChR

El AcChR purificado se reconstituye en vesículas lipídicas de diferente composición, guardando una relación molar fosfolípido:proteína de aproximadamente 3500. Las vesículas reconstituidas se cargan con el fluoróforo PTSA mediante 2-3 ciclos de congelación rápida (N_2 líquido) y descongelación lenta (a $4^\circ C$).

Para separar el fluoróforo encapsulado en las vesículas del no encapsulado, las muestras se aplican en una columna de Sepharosa 6MB (ver apartado 18.2 de este capítulo), eluyendo con Hepes 10 mM, pH 7.4, $NaNO_3$ 100 mM y recogiendo fracciones de 2 ml. Las vesículas eluyen en el volumen de exclusión y son fácilmente reconocibles por la turbidez de las fracciones, así como por la fluorescencia obtenida al excitar con una lámpara de luz ultravioleta.

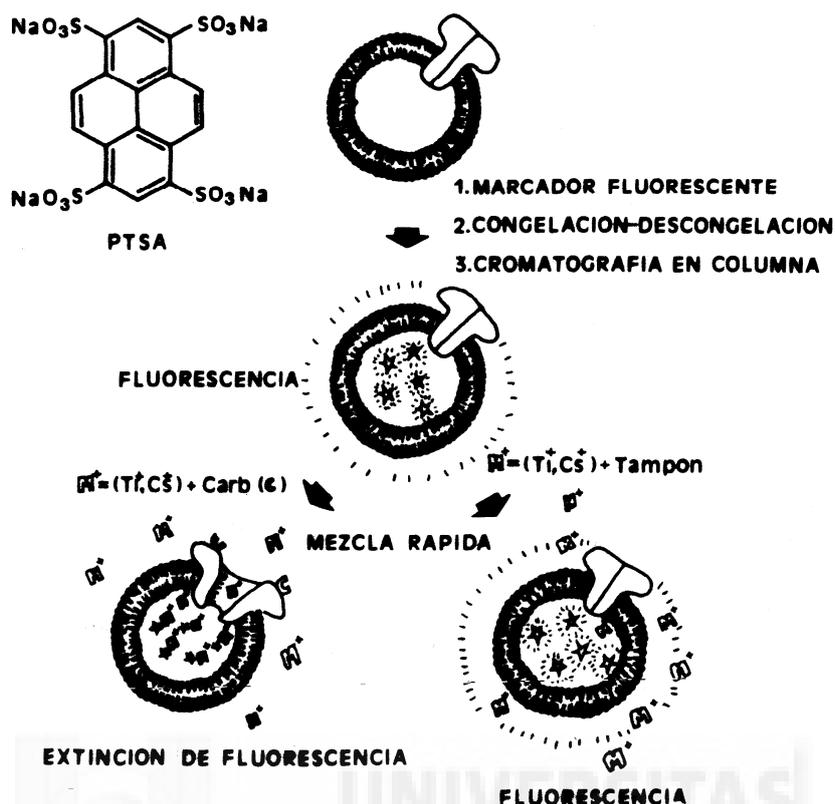


Figura 4. Esquema de la técnica de cinética rápida empleado para medir el flujo iónico a través del AcChR. En el esquema se representa la preparación de vesículas cargadas con PTSA (1, 2 y 3) y la mezcla de dichas vesículas con el tampón que contiene Tl^+ , en presencia y ausencia de carbamilcolina. Figura tomada de McNamee et al., 1986.

18.2.- Preparación de la columna de cromatografía de exclusión

Se utiliza el gel Sepharosa 6MB (Pharmacia, tamaño de grano $300\ \mu\text{m}$), del que se dispone en forma activada con CNBr, puesto que tiene un tamaño de poro que origina muy poca pérdida de muestra durante el proceso. Con el fin de neutralizar los grupos CNBr libres se incubó con Tris 1 M, pH 8, durante 12 h. a temperatura ambiente y evitando cualquier agitación magnética brusca. Una vez inactivado, el gel se empaqueta en una columna Econo Bio-Rad de $1.5 \times 27\ \text{cm}$ y se equilibra con el tampón Hepes 10 mM, NaNO_3 100 mM, pH 7.4.

18.3.- Adquisición de datos

Las trazas espectroscópicas resultantes de la disminución de la intensidad de fluorescencia con el tiempo, se obtienen en un espectrofluorímetro de flujo detenido Aminco modelo SLM-8000, equipado con: 1) una fuente de voltaje para una lámpara de arco de Xenón de 150 W, 2) una cubeta de cuarzo, 3) un sistema neumático de pistón (cuya presión de trabajo fue 4-5 bares) para mezclar los reactivos y 4) un sistema de

adquisición de datos controlado por una CPU. El tiempo muerto de mezcla del aparato fue inferior a 3 ms. Las muestras se excitaron a 374 nm, midiéndose la intensidad de emisión a través de un filtro Corning 3-75. Una de las jeringas contiene las vesículas reconstituidas cargadas con el fluoróforo en tampón Hepes 10 mM, pH 7.4, NaNO₃ 100 mM. La otra jeringa contiene el ion Tl⁺ (40 mM) en tampón Hepes 10 mM, pH 7.4, NaNO₃ 60 mM, y la concentración correspondiente de carbamilcolina (entre 25 y 500 μM). La relación de la mezcla de los reactivos para cada medida fue 1:1. Los volúmenes usuales de muestra correspondientes a cada avance del pistón fueron 0.2 ml.

Las trazas experimentales así obtenidas se ajustaron a una serie de ecuaciones tal y como se detalla en “*Obtención de parámetros cinéticos de la actividad del AcChR*” en el *Apéndice* para obtener los parámetros cinéticos de interés.

19.- Síntesis de la sonda fluorescente β-DPH HPA

La sonda comercial, 2-(3-(difenilhexatrienil) propanoil)-1-hexadecanoil- *sn*-glicero-3-fosfocolina (β-DPH HPC) (Molecular Probes), fue sometida a una digestión enzimática con fosfolipasa D, que rompe el enlace que une el grupo colina al fosfato en dicha molécula, obteniendo directamente el producto de interés: 2-(3-(difenilhexatrienil) propanoil)-1-hexadecanoil- *sn*-glicero-3-fosfato (β-DPH HPA), **figura 5**.

El protocolo que se siguió es una variación del de Comfurius (Comfurius y Zwaal, 1977). Más concretamente, 2-4 mg de β-DPH HPC se resuspendieron en 500 μl de tampón Acetato de sodio 100 mM, 100 mM CaCl₂, octilglucósido 1%, pH 5.6, agitándose durante 10 minutos a 45°C. A continuación se añadió 1 U.I. de fosfolipasa D de repollo por cada 10 mg de lípido (1 I.U. convierte 1 μmol de sustrato por minuto a 37°C) manteniéndose a 32 °C durante toda la noche en un baño con agitación. Tras ese tiempo, se añaden 400 μl de EDTA 250 mM y unas gotas de HCl para detener la reacción (pH 2-3). Con el fin de separar los componentes lipídicos del resto de reactivos se realiza una extracción. Para ello, se adicionan 4.3 volúmenes de una mezcla cloroformo:metanol (5:8) y se mantiene 30 minutos agitando para luego filtrar (filtro 934-AH de fibra de vidrio, Whatman) y lavar con esa misma mezcla orgánica. Se recoge el filtrado y se añade un volumen de agua ligeramente acidificada con HCl, y 3.7 volúmenes de cloroformo, agitando 10 minutos la mezcla. Luego se centrifuga 10 minutos a 2610 r.p.m. en centrífuga Beckman G6-S para recoger la fase orgánica y llevarla al rotavapor tras añadir etanol absoluto para eliminar las trazas de agua. El sólido que queda tras este proceso se resuspende en 500 μl de una mezcla cloroformo:metanol (9:1). Con todos estos pasos se habrá separado el β-DPH HPC y β-DPH HPC, los dos derivados lipídicos, del resto de los componentes de la reacción de carácter hidrofílico.

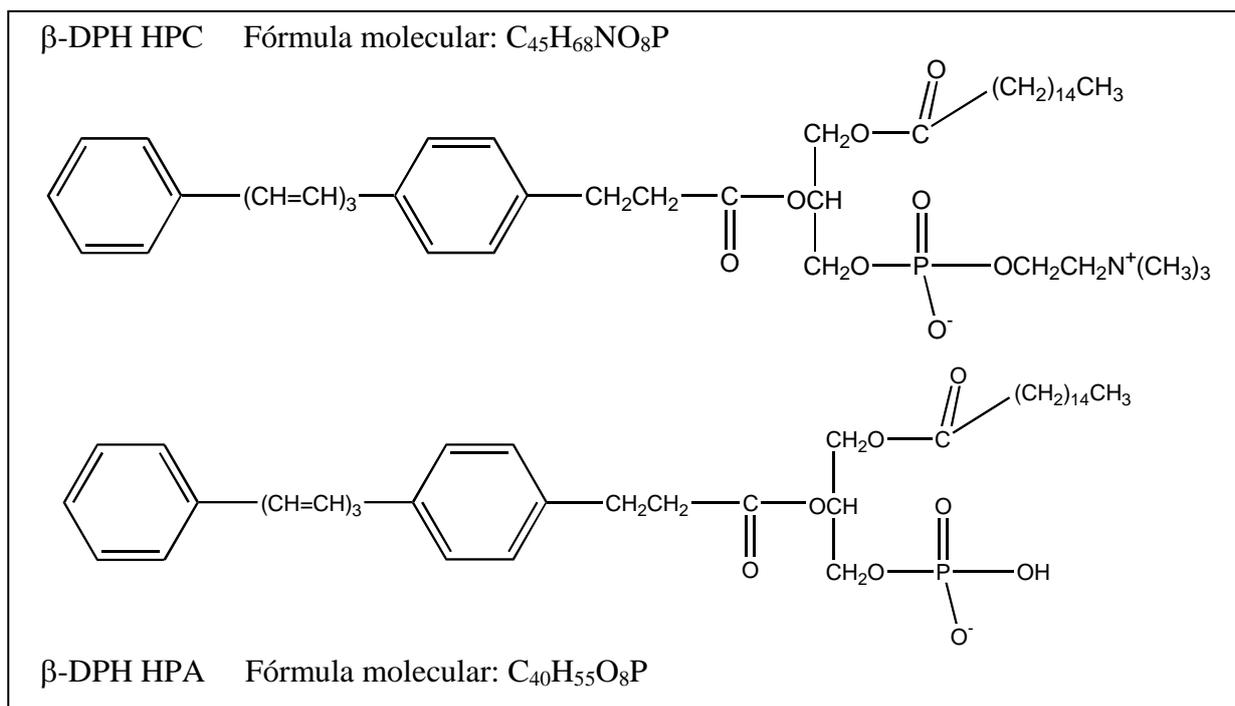


Figura 5. Estructura de las sondas fluorescentes β -DPH HPC y β -DPH HPA

19.1.- Cromatografía en capa fina (TLC)

Para poder separar la sonda producto del corte enzimático (β -DPH HPA) de la original (β -DPH HPC), se lleva a cabo una TLC en placa preparativa de Sílica-Gel 60 (Merck) de 20x20x0.5 cm y una fase móvil compuesta por cloroformo:etanol:agua:trietilamina (25:35:6:35). Se aplica el producto obtenido tras las extracciones y una vez el frente alcanza el final de la placa, se deja 15 minutos, tras lo que se saca de la cubeta y se deja secar. Para observar los productos, se aplica a una pequeña porción de la placa Phospray (Sigma), que marca todo tipo de fosfolípidos con un color azul, si bien los destruye.

Una vez que se ha comprobado la adecuada separación del producto, se rasca la zona de la placa que lo contiene, a excepción de la que ha sido rociada con Phospray, para luego extraer el fosfolípido de la propia sílica. Para ello se mezcla el polvo de sílica con 6 ml de cloroformo:metanol (2:1 v/v) durante 15 minutos para luego centrifugar la mezcla a 2610 r.p.m en centrífuga Beckman G6-S durante 10 minutos. Tras ello, se recoge el sobrenadante y a la sílica que queda en el fondo se le vuelve a añadir 6 ml de la mezcla orgánica. Este, proceso se repite tres veces y luego otras dos pero con 6 ml de cloroformo:metanol:agua (2:5:0.5). Se unen todos los sobrenadantes de estas 5 extracciones y se vuelven a centrifugar 10 minutos a 2610 r.p.m., tras lo cual se pasan al rotavapor, obteniéndose el producto purificado. Para almacenarlo, se resuspende en cloroformo:metanol (2:1) y se guarda a $-30^{\circ}C$.

RESULTADOS



1.- El receptor nicotínico de acetilcolina reconstituido en vesículas lipídicas de composición compleja segrega un dominio lipídico

El AcChR se reconstituye en matrices lipídicas de composición controlada con el fin de observar si es capaz de reorganizar su entorno lipídico, ya que hay evidencias experimentales de su preferencia en la unión por ciertos lípidos, como el colesterol y el ácido fosfatídico. Estas preferencias podrían tener implicaciones funcionales y estructurales como se expone en el apartado “*Interacción con lípidos de membrana*” de la *Introducción* de la presente memoria.

Las matrices lipídicas se componen de DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) que contienen una base de PC de huevo, un fosfolípido muy abundante en membranas naturales, colesterol en un alto porcentaje, también muy abundante en estas membranas, siendo además un lípido que interacciona con la proteína y que parece fundamental para su óptima función. Por último, un 25% de DMPA, fosfolípido aparentemente imprescindible para la función de la proteína y que también interacciona preferentemente con ella. Por tanto disponemos de una matriz con una cierta complejidad con la que poder simular de alguna manera una membrana natural. Asimismo, puesto que el DMPA es un fosfolípido sintético, es capaz de experimentar una transición de fase detectable mediante diferentes técnicas, y por lo tanto será nuestra sonda dentro el sistema. Como control a este tipo de experimentos, siempre se utilizan muestras sin proteína o se sustituye el DMPA por DMPC, un fosfolípido por el que la proteína no tiene preferencia, pero que también es capaz de experimentar una transición de fase y por tanto también detectable. El hecho de utilizar los derivados dimiristoilados en ambos fosfolípidos (PC y PA), se debe a que presentan una temperatura de transición de fase gel a líquido cristalino de fácil seguimiento en experimentos de calorimetría diferencial de barrido (Blume, 1988) o en el resto de técnicas utilizadas.

1.1.- Estudios de la reorganización lipídica inducida por el AcChR mediante FTIR

En membranas naturales o en vesículas de composición compleja como las que se usan en estos estudios, la observación de bandas de infrarrojo de lípidos específicos es impedida por la superposición de señales procedentes de los distintos tipos lipídicos. Para solventar esta limitación, se utilizan lípidos perdeuterados, para los que las frecuencias de vibración de tensión de los enlaces C-D (2000-2300) son marcadamente diferentes de las del enlace C-H (2800-3100), provenientes del resto de los lípidos, y que por tanto permiten un seguimiento por separado de dichos lípidos (Casal y Mantsch, 1984; Jaworsky y Mendelsohn, 1986; Mantsch y McElhaney, 1991). De este modo, se

prepararon muestras del AcChR reconstituido en mezclas lipídicas con 50% PC de huevo, 25% colesterol y 25% de DMPA perdeuterado (d-DMPA) o DMPC perdeuterado (d-DMPC) con una relación fosfolípido/proteína de ~3500 molar. En la **figura 1** se muestran los cambios observados con el aumento de temperatura en la frecuencia de la banda de tensión simétrica CD_2 en las dos muestras de AcChR reconstituido mencionadas anteriormente, así como en vesículas sin proteína pero de idéntica composición. De todos los modos de vibración C-D de los fosfolípidos perdeuterados que son detectados mediante esta técnica, se seleccionó la tensión simétrica CD_2 para ilustrar estos experimentos porque es la que mayores cambios en frecuencia y en anchura de banda muestra al incrementar la temperatura (Casal y Mantsch, 1984). La **figura 1A**, muestra que la vibración CD_2 que proviene del d-DMPC no depende de la temperatura y exhibe valores de frecuencia similares en las vesículas con y sin receptor, lo que sugiere que la mezcla del d-DMPC con el resto de los lípidos dentro de este tipo de vesículas tiene un comportamiento ideal y que no hay dominios enriquecidos en este fosfolípido. En la **figura 1B** se muestra que la vibración CD_2 proveniente del d-DMPA en vesículas sin AcChR, exhibe un comportamiento similar al visto para d-DMPC. Por el contrario, la presencia de la proteína en este tipo de vesículas que contienen d-DMPA da lugar a que la vibración CD_2 muestre una clara dependencia con la temperatura, sugiriendo que la proteína induce un cambio drástico en el modo en que el d-DMPA se organiza, dando lugar a una mezcla no ideal dentro de la vesícula lipídica. El cambio con la temperatura de esta señal se da con una cierta cooperatividad y presenta un punto de inflexión alrededor de los 35 °C (**figura 1B**).

Con el fin de facilitar la comparación de los cambios de señal inducidos por la temperatura, la **figura 1C** muestra los efectos de la temperatura en SUVs hechas exclusivamente de d-DMPA a pH 6 y 9.4, que reflejan el comportamiento de las formas monoaniónicas y dianiónicas puras de este fosfolípido, respectivamente. Como es esperado, al seguir la vibración CD_2 en estas muestras, aparece una transición de fase muy cooperativa por encima de los 50°C para la forma monoaniónica del d-DMPA y a 45°C la de la forma dianiónica. A pesar del control grosero de la temperatura en estos experimentos, los valores estimados para las T_m son similares a los calculados en experimentos de DSC, 51 y 45°C, respectivamente, para las formas puras monoaniónicas y dianiónicas del DMPA no perdeuterado (Blume, 1988). Desde un punto de vista espectroscópico, podemos observar notables diferencias entre el DMPA en vesículas de DMPAd+PC de huevo+Col, en presencia de AcChR, respecto al DMPAd puro, tanto en la frecuencia de vibración como en la T_m de la transición. El DMPA segregado por el AcChR presenta un mayor número de conformeros *gauche* en todo el rango de temperatura utilizado, a juzgar por las frecuencias de CD_2 . En cuanto a las muestras de DMPA+PC de huevo+Col, o las de DMPCd+PC de huevo+Col con y

sin AcChR, las tres presentan un número de conformeros *gauche* similar al DMPAD puro en estado fluido, normal teniendo en cuenta que en estas vesículas hay una mezcla ideal de los componentes con lo que no hay transición de fase alguna. Por tanto la presencia del AcChR de por si no parece aumentar el número de conformeros *gauche* de los fosfolípidos deuterados, por lo que en el caso de las muestras en las que el AcChR promueve la segregación del DMPAD, debe de haber una interacción entre ambos componentes que explique este fenómeno.

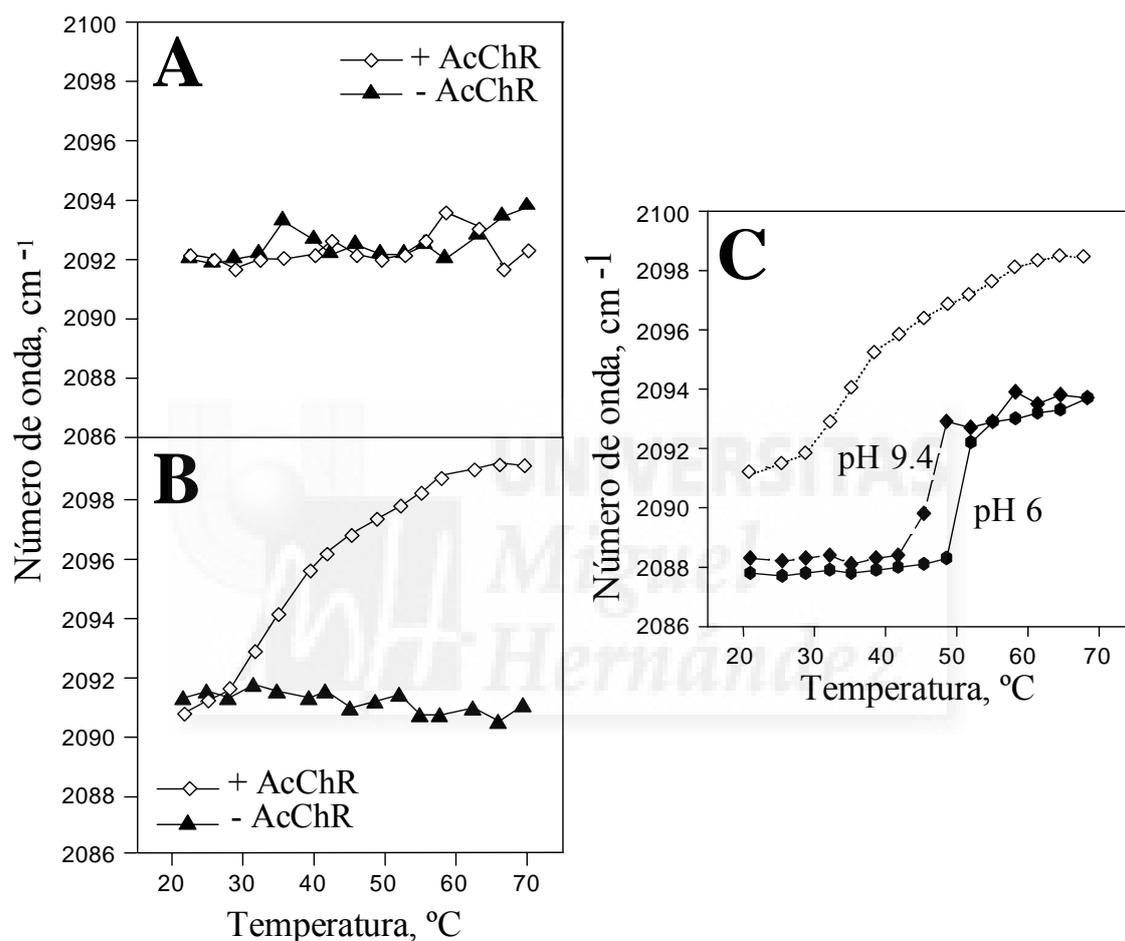


Figura 1. Variación de las vibraciones CD_2 con la temperatura. La composición de las matrices lipídicas es A) DMPCd+PC de huevo+Col (25:50:25, razón molar), B) DMPAd+PC de huevo+Col (25:50:25, razón molar). En C) se compara la muestra de DMPAd+PC de huevo+Col + AcChR con DMPAd puro a pH 6 y 9,6. En presencia de AcChR la relación molar fosfolípido/proteína es 3500. Se utiliza el tampón Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4 salvo para las muestras de DMPAd puro (MOPS 10 mM, CAPS 10 mM, acetato sódico 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 0.1 mM, pH 6 y 9,6). Los espectros de FT-IR se tomaron en H_2O .

1.2.- Estudios de DSC sobre la reorganización lipídica inducida por el AcChR reconstituido en vesículas lipídicas

Con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos mediante FTIR en cuanto a la segregación del DMPA en vesículas lipídicas complejas, se llevaron a cabo estudios de calorimetría diferencial de barrido (DSC) en vesículas de DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) con AcChR (relación molar fosfolípido/proteína 3500) y sin AcChR. Cuando la proteína no está presente, no es detectada ninguna endoterma en el rango de temperaturas de 20-60 °C, como es de esperar que ocurra en vesículas de composición lipídica compleja en la que hay una mezcla ideal de sus componentes (**figura 2**). Por el contrario, la presencia del AcChR en el mismo tipo de vesículas da lugar a la aparición de una pequeña, reversible, ya que aparece en el primer y segundo barrido, y relativamente estrecha endoterma, con una temperatura de transición de 42 ± 2 °C¹. También se puede apreciar otra endoterma solapada con la anterior a menor temperatura y mucho más ancha, es decir, menos cooperativa. En el primer barrido aparece una endoterma a alta temperatura (55.8 ± 1 °C) que corresponde con la desnaturalización del AcChR (Artigues et al., 1987; Castresana et al., 1992). Su pequeño tamaño se debe a la poca cantidad de proteína presente en la muestra. A pesar de que la proteína quede desnaturalizada tras un primer espectro, la transición calorimétrica proveniente de los lípidos vuelve a aparecer en un segundo espectro, aunque a una menor Tm (41.2 ± 2) y con una cooperatividad y entalpía, deducidas a partir de la anchura y área del pico de transición respectivamente, aparentemente algo menores (**figura 2**). En este segundo barrido, también se puede observar que permanece la endoterma a baja temperatura y que el pico de la endoterma a alta temperatura pierde altura respecto la misma. Estas apreciaciones son cualitativas ya que el valor exacto de la entalpía y cooperatividad de estos procesos es difícil de calcular debido al complejo perfil que presentan estos barridos, con aparentemente más de una endoterma solapada y sin una línea base claramente definida.

Para poder comparar estos termogramas con el del DMPA puro, se muestra en la figura la transición endotérmica de este fosfolípido, preparado con los mismos pasos experimentales que las matrices lipídicas de composición compleja arriba mencionadas, obteniéndose una entalpía de 3.8 ± 0.2 kcal/mol y una temperatura de 49.5 ± 1 °C, valores algo alejados de los establecidos en la literatura (Blume, 1988), si bien los procesos de solubilización con detergente y diálisis podrían justificar tales variaciones. De estos datos se deduce que el DMPA segregado por parte del AcChR sufre una transición de fase tipo gel-líquido cristalino aunque bastante alterada respecto a la del DMPA puro. En cualquier caso, es destacable la detección del efecto del AcChR sobre la

¹ Los valores de Tm son el promedio \pm desviación estándar, siendo $n \geq 3$.

reorganización de las vesículas lipídicas en que se reconstituye pese a estar presente a una relación molar muy pequeña, lo que indica que el proceso es altamente específico.

Otro detalle que se puede apreciar en este experimento es que las muestras que presentan dominio segregado por el AcChR tienen termogramas a valores de C_p menores que sin ella, al contrario de lo que se esperaría ya que las interacciones lípido-proteína tienden a aumentar el valor de este parámetro. Esto significa que la proteína provoca la variación de alguno de los parámetros físicos de los lípidos en que se reconstituye, dando lugar a una disminución de C_p . En la figura 2 esto no se puede ver ya que no se ha utilizado una escala de C_p absoluta sino relativa.

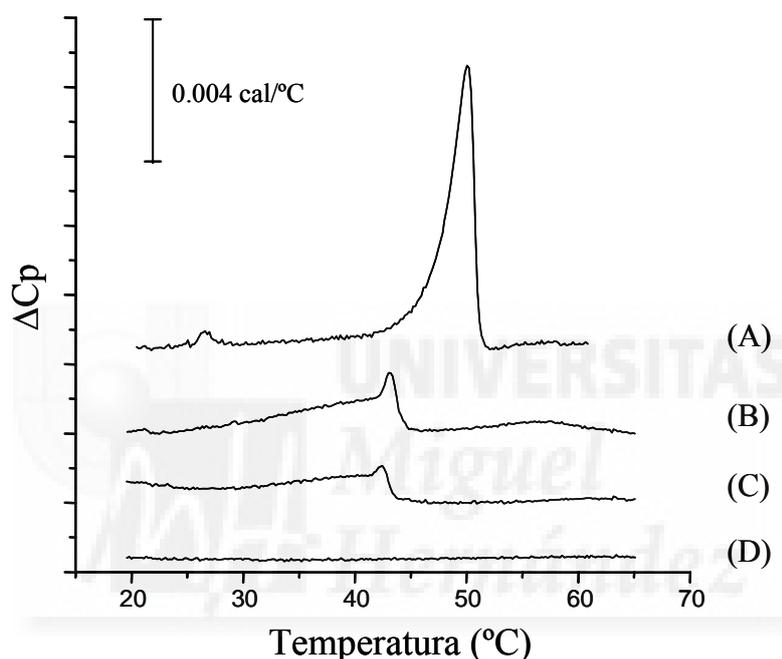


Figura 2. DSC de diferentes mezclas lipídicas. Se muestran los termogramas de DSC, una vez restada la línea base, de muestras compuestas por DMPA puro (A), DMPA:PC de huevo:Col (25:50:25 relación molar) con AcChR, relación molar fosfolípido/proteína 3500, (B, primer barrido), (C, segundo barrido) y sin la proteína (D). Todas las muestras han pasado por los mismos procesos de diálisis y detergentes, quedando finalmente en tampón Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4. Concentración final de DMPA 10 mM en todas las muestras.

1.3.- Estudios de Anisotropía de Fluorescencia sobre la reorganización lipídica inducida por el AcChR reconstituido en vesículas lipídicas

Otra técnica mediante la cual podemos detectar transiciones de fase y por lo tanto detectar el dominio lipídico segregado por el AcChR es la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario. La anisotropía de una sonda está relacionada con el “orden” de su microentorno, por lo que cuando se produce un cambio de fase

cooperativo en una matriz lipídica desde una fase gel, en la que los lípidos están “ordenados”, a una fase líquido-cristalino en la que los lípidos están más “desordenados”, la anisotropía de una sonda embebida en esa matriz sufrirá también un cambio brusco de anisotropía (ver “*Anisotropía de fluorescencia*” en *Apéndice*).

Cinco sondas fluorescentes se probaron para intentar detectar el dominio lipídico: *t*-PnA, DPH, PA-DPH, DHE y Laurdan. La primera de ellas tiene preferencia por lípidos en fase gel (Sklar et al., 1979), donde además aumenta su rendimiento cuántico, por lo que es ideal para detectar dominios en fase gel aunque sean muy pequeños. Sin embargo, la segunda se reparte homogéneamente en todo tipo de fases lipídicas y se coloca en la región más interna de la bicapa, junto a las cadenas acílicas de los fosfolípidos (Lentz et al., 1976). PA-DPH es una molécula de DPH derivatizada con ácido propiónico, que le aporta una carga negativa situándose así cerca de la superficie de las membranas (Trotter et al., 1989), mientras que el DHE se ha usado frecuentemente como un análogo fluorescente del colesterol (Rogers et al., 1979; Muczynski y Stahl, 1983; Smutzer y Yeagle, 1985). Por último se utilizó el Laurdan, una sonda sensible a la polaridad y a la dinámica molecular de los dipolos de su microentorno, lo que la hace sensible a la fase del lípido en que se encuentra (Parasassi et al., 1990, 1991). Las cinco sondas fueron añadidas a vesículas lipídicas compuestas por DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) en presencia o ausencia del AcChR. Se midió entonces la anisotropía de fluorescencia de cada una de las sondas en función de la temperatura. Hay que tener en cuenta que en los experimentos de fluorescencia no se puede trabajar con muestras muy concentradas ya que habría una gran dispersión de luz que provocaría una medida errónea de la anisotropía (ver apartado 15, “*Medidas espectroscópicas*” en *Materiales y Métodos*). Por esta razón en vez de una concentración 10 mM de DMPA utilizada en calorimetría, se pasó a 0.12 mM en fluorescencia. Con esta pequeña cantidad de DMPA, a una relación molar de fosfolípido total/AcChR de 3500 como la de las muestras de calorimetría, no se observa ningún cambio de fase (datos no mostrados). Sin embargo, con el mismo lípido pero en presencia de una mayor cantidad de proteína, es decir, a una relación molar fosfolípido/proteína menor, en este caso 564, sí que se detecta una transición de fase correspondiente al DMPA segregado por la proteína, para la sonda *t*-PnA (**figura 3**). Esto quiere decir que gran parte de este fosfolípido no había sido segregado por la proteína, razonamiento que sirvió de base para calcular la estequiometría del dominio como se detalla más adelante.

En la **figura 3** se pueden observar las curvas de anisotropía para las diferentes sondas en muestras a una relación molar fosfolípido/AcChR 564. Sólo el *t*-PnA da una clara curva sigmoideal cuando el AcChR está presente, típica de un cambio de fase de lípido e indicativo de la presencia del dominio de PA. La proteína provoca un aumento

de la anisotropía a baja temperatura, debido a la presencia de lípidos en fase tipo gel, que al aumentar la temperatura pasan a una fase más fluida, similar a la de la mezcla lipídica sin proteína. Con esta sonda también se pudo comprobar que el proceso es reversible como ya indicaban los experimentos de calorimetría (dato no mostrado). El inconveniente que tiene esta sonda es su sensibilidad al oxígeno y a la temperatura (Sklar et al., 1977; Hudson et al., 1986), por lo que no se pueden tomar muchos puntos a lo largo de una rampa de temperatura, con lo que el error en el ajuste de la sigmoide para calcular la T_m a los datos experimentales es relativamente grande. Para el resto de las sondas lipídicas usadas, DPH, PA-DPH y DHE, la variación de anisotropía con la temperatura describe una curva sigmoideal muy suave, casi imperceptible, aunque el ajuste a este tipo de curva da valores de temperatura de transición muy parecida a la obtenida con el t -PnA, aproximadamente a 33-34°C, excepto en el caso del DHE que se va hasta los 41.5 °C (ver **tabla 1**).

Tabla 1. Temperatura de transición de fase detectada por diferentes sondas fluorescentes.

Estas sondas se incorporaron a vesículas de DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) con AcChR en una relación molar fosfolípido/proteína de 564. La anisotropía de estas sondas se siguió con la temperatura y del ajuste de dichos datos a curvas sigmoideales se obtiene la temperatura de transición de fase (\pm s.d.) de las vesículas lipídicas ($n>3$ excepto en DHE donde $n=1$). En el caso del Laurdan se siguió el parámetro exGP

Sonda	DPH	PA-DPH	DHE	Laurdan	t -PnA
T_m (°C)	33.7 \pm 2	34.3 \pm 2	41.5	--	32 \pm 3

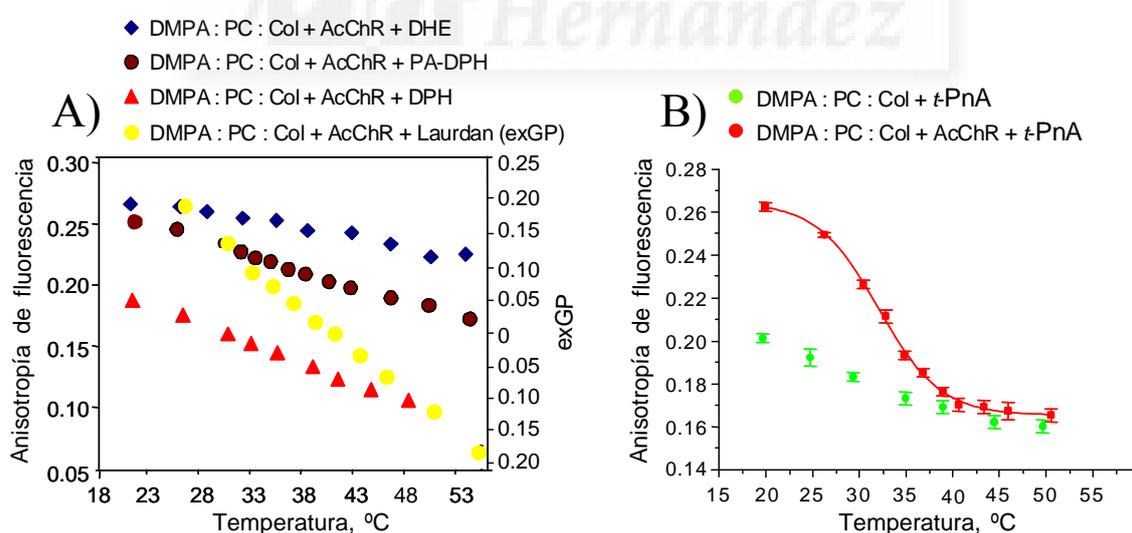


Figura 3. Anisotropía de fluorescencia de diferentes sondas. Se presentan las curvas de anisotropía de fluorescencia frente a temperatura en muestras de DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) con AcChR a una relación molar fosfolípido/proteína de 564 o sin AcChR, a las que se les ha añadido una sonda fluorescente, DPH, PADPH, Laurdan, DHE en el **panel A** o t -PnA en el **panel B**. En el caso del Laurdan, se siguió la polarización generalizada (exGP), **panel A**. Concentración final de DMPA en todas las muestras 0.12 mM. El tampón en todos los casos fue Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4.

En el caso del Laurdan se siguió la polarización generalizada (exGP, ver “*Polarización generalizada de fluorescencia*” en *Apéndice*), parámetro que integra las propiedades espectroscópicas de esta sonda y que es muy sensible a la fase en que se encuentra una membrana. En este caso, no se obtuvo ningún cambio con la temperatura, lo que significa que esta sonda no es capaz de detectar el dominio.

Los experimentos realizados con distintas aproximaciones: DSC, FTIR y Anisotropía de Fluorescencia, sugieren que en ausencia de AcChR las muestras de DMPA:PC de huevo:Col tienen una mezcla homogénea de sus componentes. Sin embargo, la presencia de AcChR provoca la reorganización de estas matrices, segregando un dominio lipídico que exhibe una transición cooperativa de fase con una T_m en torno a 35-40 °C. Obviamente, el único componente de la mezcla capaz de formar ese dominio es el DMPA, puesto que ningún otro lípido puede sufrir una transición cooperativa de fase. Esto queda totalmente confirmado en los experimentos de FT-IR en los que el cambio de fase y por tanto el dominio se detecta a través del grupo C-D, siendo el único componente lipídico deuterado de la muestra el DMPA.

Debido a que las muestras utilizadas en estos experimentos son mezclas de lípidos y que el procesado de las mismas es complejo, hay bastante variabilidad en la transición de fase del dominio detectada por cualquiera de las técnicas utilizadas, sobre todo entre muestras de diferentes purificaciones de AcChR. Por esta razón, en todos los experimentos que se presentan a lo largo de esta memoria, siempre se ha usado una muestra control a la que se refieren los resultados de ese experimento.

Como se ha comentado anteriormente, la sonda Laurdan no parece detectar la transición de fase del dominio segregado por el AcChR, posiblemente porque esta sonda no se distribuye preferentemente en el mismo. Aún así, se realizaron experimentos de medida de exGP de esta sonda a diferentes longitudes de onda ya que a partir de los valores de este parámetro es posible detectar la coexistencia de diferentes fases en una misma membrana (Parasassi et al., 1993, ver apartado 4, “*Polarización generalizada de fluorescencia*” en *Apéndice*). Esta sonda se añadió a vesículas de DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 25.50:25) con AcChR, relación molar fosfolípido/proteína 564. Los experimentos se realizaron a 20 °C, temperatura en la que debe haber dos fases lipídicas, el dominio segregado en fase gel y el resto de los lípidos en fase fluida, y a 56 °C, temperatura a la que se espera la existencia de sólo una fase lipídica, según los datos aportados por la anisotropía de fluorescencia de la sonda *t*-PnA para este tipo de muestras (**figura 4**). También se realizaron los mismos experimentos en muestras sin AcChR como control. Los resultados obtenidos son similares tanto en presencia como en ausencia del receptor a las dos temperaturas probadas, con una ligera tendencia del valor de exGP a disminuir al aumentar la longitud de onda. Lógicamente a alta temperatura los valores de exGP son menores a cualquier longitud de onda. También se

observa que con AcChR los valores de exGP aumentan ligeramente a las dos temperaturas. Este tipo de variación de exGP con la longitud de onda indica la presencia de una sola fase lipídica del tipo “líquido-ordenado”, muy común en membranas ricas en colesterol (Antollini et al., 1996).

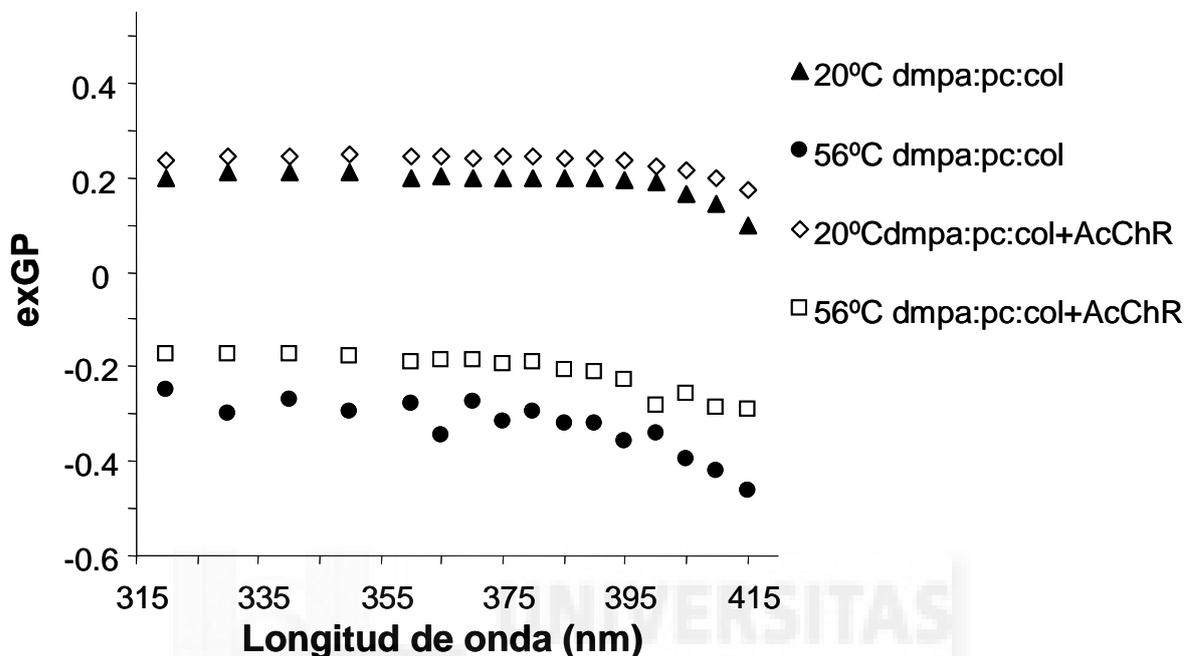


Figura 4 . exGP de la sonda Laurdan en vesículas lipídicas. A muestras de DMPA:PC:Col (relación molar 25:50:25) con AcChR, relación molar fosfolípido/proteína 564, o sin el receptor, se les añadió la sonda fluorescente Laurdan y se midió su exGP a diferentes longitudes de onda. El experimento se realizó a 20 °C y 56 °C. Concentración final DMPA 0.12 mM.

2.- Composición del dominio lipídico

La transición de fase del dominio detectado mediante las tres técnicas experimentales arriba mencionadas ocurre a una temperatura y con una entalpía de transición mucho menores que para el DMPA puro, incluso considerando que, a causa del proceso de diálisis de detergente usado para preparar las vesículas reconstituidas, la entalpía de transición del DMPA puro disminuye a unos 3.8 Kcal/mol desde unos 5.74 kcal/mol, valor obtenido con vesículas multilamelares mediante DSC (Blume, 1988).

Una posibilidad para explicar estos resultados es que la segregación del DMPA no se haga como una especie pura, sino quizás mezclado con otros componentes presentes en la matriz lipídica, como son el PC de huevo y el colesterol. También es posible que el AcChR por sí mismo provoque estos cambios. Para dar respuesta a estas cuestiones, se realizaron experimentos de DSC y de anisotropía de fluorescencia. En ambos casos, el AcChR se reconstituyó en vesículas sin colesterol, DMPA:PC relación molar 25:50 y en vesículas con colesterol, DMPA:PC de huevo:Col relación molar

25:50:25, así como en vesículas de DMPA puro. En los experimentos de anisotropía de fluorescencia se usó una relación molar fosfolípido/proteína de 564 y la sonda fluorescente *t*-PnA. Para la calorimetría diferencial de barrido se utilizó una relación molar fosfolípido/proteína de 3500.

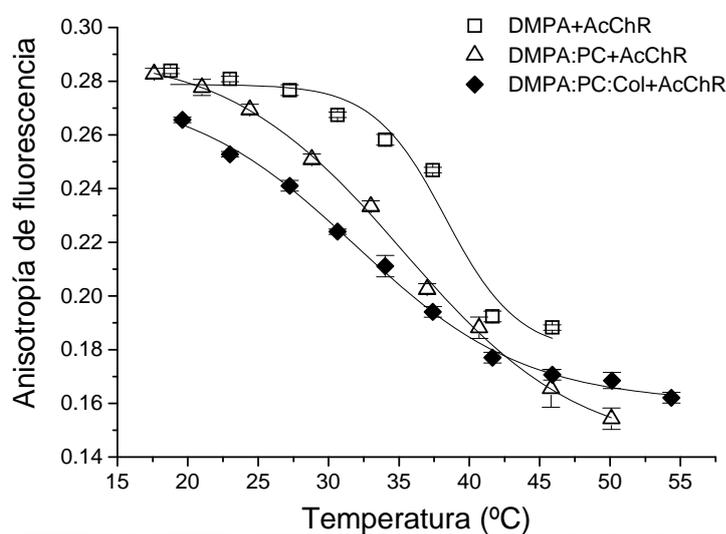


Figura 5. Anisotropía de fluorescencia de *t*-PnA en diferentes matrices lipídicas. Se presenta la variación de la anisotropía de fluorescencia de la sonda *t*-PnA con la temperatura para diferentes matrices lipídicas en presencia de AcChR. La relación molar entre los componentes de las diferentes matrices fue: 100% DMPA (**DMPA+AcChR**), 25% DMPA + 50% PC de huevo (**DMPA:PC+AcChR**) y 25% DMPA + 50% PC de huevo + 25% colesterol (**DMPA:PC:Col+AcChR**). La relación molar fosfolípido/AcChR fue de 150 para la DMPA pura y 564 para el resto. Concentración final DMPA 0.12 mM. El tampón utilizado fue Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4. Los datos se representan \pm s.e.

En la **figura 5** se puede observar que cuando la proteína es reconstituida con DMPA puro, la temperatura de transición ($38.3 \pm 1^\circ\text{C}$) es ya bastante diferente a la del DMPA sin proteína ($49.5 \pm 1^\circ\text{C}$ según los datos de DSC), pero es aún menor si el PC de huevo está presente ($35.3 \pm 1.2^\circ\text{C}$). Cuando el colesterol se incluye en las vesículas, la temperatura de transición detectada disminuye hasta los $32 \pm 3^\circ\text{C}$, así como la anisotropía a bajas temperaturas, mientras que hay un aumento de la anisotropía a altas temperaturas. Aunque los valores medios de las T_m con sus desviaciones estándar puedan solaparse debido a la variabilidad de los valores en diferentes muestras y al error asociado al ajuste de estas curvas, el colesterol en todos los experimentos realizados provoca una disminución de la T_m . Por tanto, se confirma que el colesterol tiene efectos sobre las características físicas del dominio lipídico, indicativo de su presencia en el mismo. También hay que destacar el fuerte efecto que la proteína de por sí ejerce sobre el DMPA, aunque en este caso no hay dominio sino una matriz pura de este fosfolípido.

La relación molar fosfolípido/AcChR para la muestra de DMPA puro es de 150 para que sea igual que la relación DMPA/AcChR de las otras muestras.

Los resultados obtenidos por DSC son similares a los anteriores, con un fuerte efecto del colesterol, que en este caso se aprecia por la disminución en la T_m y entalpía de la transición de fase del dominio (**figura 6**). Sin embargo, a diferencia de los experimentos por anisotropía de fluorescencia, la presencia de AcChR en DMPA puro produce un aumento de la T_m (53 ± 1 °C) respecto al fosfolípido sin proteína (49.5 ± 1 °C), si bien la relación molar fosfolípido/AcChR en este caso es 3500 frente a 150 de las muestras para fluorescencia.

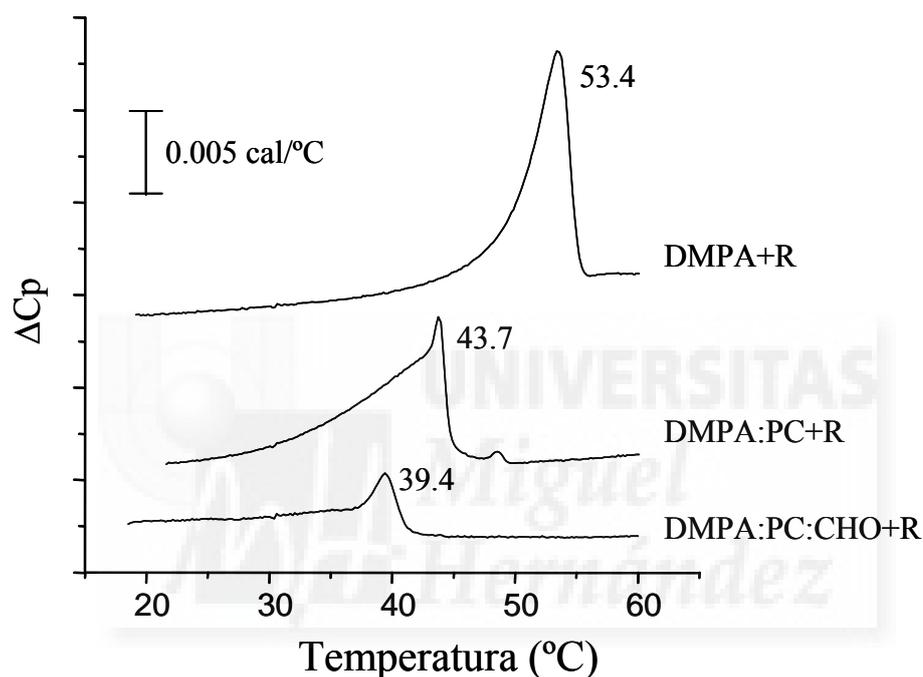


Figura 6. DSC de muestras con y sin colesterol. Se tomaron los termogramas de muestras compuestas por DMPA puro, DMPA:PC de huevo (25:50 relación molar) y DMPA:PC de huevo:Col (25:50:25 relación molar), todas con AcChR en una relación molar fosfolípido/proteína 3500. Los termogramas mostrados resultan tras restar la línea base del segundo barrido de cada muestra, y a su lado se indica la T_m obtenida para los mismos. La concentración final de DMPA en todas las muestras es 10 mM. El tampón en todos los casos fue Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4.

En todos estos experimentos, la muestra de DMPA:PC de huevo+AcChR sirve de control respecto a la de DMPA:PC de huevo:Col+AcChR, confirmando la presencia de este lípido en el dominio segregado por el AcChR. Sin embargo, la primera de estas muestras carece a su vez de un buen control, ya que en la muestra de DMPA puro con AcChR realmente no hay una segregación del DMPA de otros lípidos, si bien confirma que la proteína por sí sola es capaz de disminuir la T_m del DMPA a altas concentraciones. Si aún así se tomara la muestra de DMPA+AcChR como control, se

podría decir que la PC daría lugar a una disminución de la T_m y entalpía de la transición de fase asociada al dominio, sugiriendo su presencia en el mismo. Debido a la difícil interpretación de estos resultados, sobre todo en cuanto al efecto de la PC en el dominio, se decidió estudiar esta cuestión con otro tipo de aproximación. Para ello, se realizaron experimentos de calorimetría partiendo de vesículas lipídicas compuestas por DMPA puro y sin proteína, y variando sistemáticamente la composición de las mismas añadiendo cantidades crecientes de PC de huevo y colesterol, a fin de obtener una transición de fase similar a la encontrada en las muestras de DMPA:PC de huevo:Col con AcChR, proveniente del dominio. Las vesículas se procesaron de la misma forma con la que se realizaron las muestras de los experimentos anteriores, pero en ausencia del AcChR.

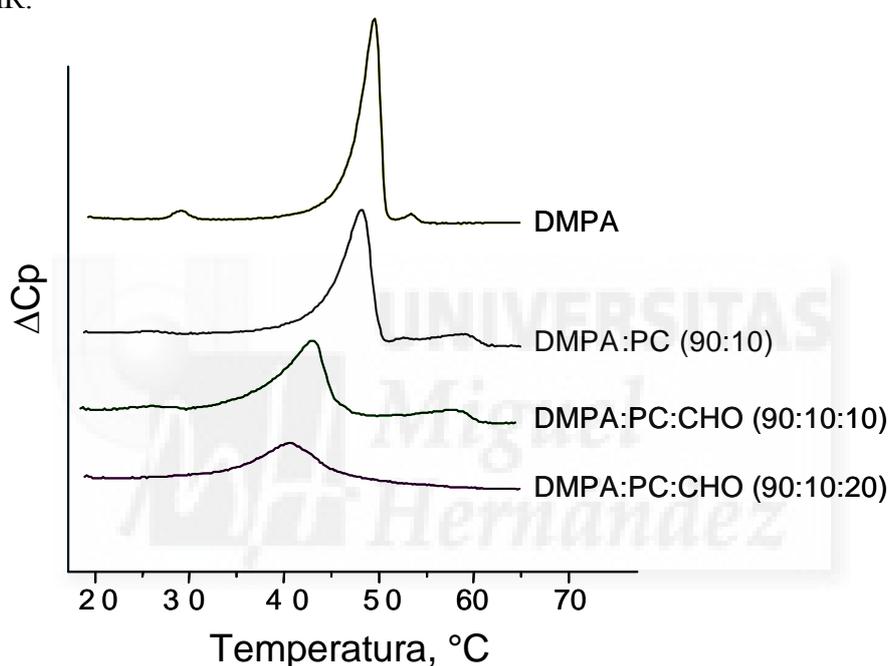


Figura 7. DSC de vesículas lipídicas con diferente composición. En la figura se muestran los termogramas de DSC, una vez restada la línea base, de vesículas lipídicas, todas ellas obtenidas siguiendo el mismo protocolo que para las muestras con AcChR. La composición lipídica se indica a la derecha de cada termograma con la relación molar de los componentes entre paréntesis. Concentración DMPA final en todas las muestras 10 mM. El tampón utilizado fue Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4.

En la **figura 7** se puede observar como al aumentar la relación molar de PC de huevo en una matriz DMPA:PC de huevo, la transición de fase del DMPA disminuye en entalpía pero apenas en temperatura (sólo 3-3.5 °C) respecto a la del fosfolípido puro. Una mayor proporción de PC no varía más la T_m , pero sí disminuye el área de la endoterma hasta hacerla desaparecer (dato no mostrado). Este nulo efecto de la PC sobre la T_m no es el mismo que el observado en los experimentos anteriores de anisotropía de fluorescencia o DSC con AcChR tomando la muestra DMPA+AcChR como control, lo que nos indicaría que ésta no es un buen control para evaluar el efecto

de la PC sobre la transición de fase del dominio. Por tanto, la baja temperatura de transición que presentan las muestras de DMPA:PC de huevo+AcChR pudiera ser causada directamente por la proteína y no por la PC. Por el contrario, al aumentar la cantidad de colesterol en vesículas de DMPA:PC de huevo:Col sin proteína, se produce una disminución tanto de la entalpía como de la temperatura de la transición. De hecho, las vesículas de composición DMPA:PC de huevo:Col de relación molar 90:10:20, exhiben una endoterma con una transición de fase de aproximadamente 40°C, muy parecida a la observada en las vesículas reconstituidas con AcChR y de composición DMPA:PC de huevo:Col de relación molar 25:50:25. Este experimento nos ofrece una posible composición del dominio segregado por el AcChR. El inconveniente en este caso es que se desestima el efecto directo que la proteína ejerce sobre los lípidos segregados en el dominio que, como se ha comentado anteriormente, parece evidente.

3.- Estequiometría del dominio

Los primeros experimentos en los que se detectó la presencia del dominio se realizaron a una alta relación molar lípido-proteína de 3500. Pese a esto, tanto en DSC como en FTIR aparece dicho dominio claramente, si bien con una entalpía bastante pequeña. Sin embargo, mediante anisotropía de fluorescencia no se detectó ningún cambio a esa relación lípido-proteína. Una posibilidad para explicar estos resultados es que sólo un pequeño porcentaje de DMPA participe en los dominios segregados por la proteína debido a la pequeña cantidad de la misma presente en las muestras en relación al lípido total. Si el AcChR es responsable de la formación del dominio, es de esperar que al aumentar la cantidad del mismo en las muestras, manteniendo el lípido fijo, aumente la cantidad de DMPA secuestrado en los dominios hasta llegar a una situación en la que todo este fosfolípido quede segregado. A partir de este momento, si se sigue añadiendo más AcChR, o bien se llega a una situación estable ya que no hay más DMPA que secuestrar, o podría haber una perturbación de los dominios ya formados. Con estas ideas en mente, se llevaron a cabo experimentos de calorimetría y anisotropía de fluorescencia con matrices de DMPA:PC de huevo:Col (25:50:25 relación molar), en las que se había detectado el dominio, a diferentes relaciones molares lípido-proteína, pero manteniendo fija la cantidad de lípido y variando la cantidad de proteína. Por tanto, si se detecta una mayor cantidad de dominio, habrá de ser debido a una mayor segregación del DMPA por parte de la proteína y no porque haya una mayor cantidad de este fosfolípido.

En los experimentos de DSC, sólo se probó una relación molar fosfolípido-proteína de 564 a parte de la anteriormente mencionada de 3500. Se puede observar en la **figura 8** que la entalpía del proceso es mucho mayor para la relación molar 564 que para la de 3500. Este hecho revela que una mayor cantidad de proteína presente en las

vesículas da lugar a una mayor cantidad de DMPA segregado. También se puede observar la reversibilidad del proceso y la desnaturalización del AcChR como una endoterma a unos 55°C, que evidentemente ya no aparece en un segundo barrido. La diferencia entre la T_m del dominio entre las dos muestras a diferente relación lípido-proteína se puede justificar por la variabilidad implícita que hay entre muestras de diferentes purificaciones.

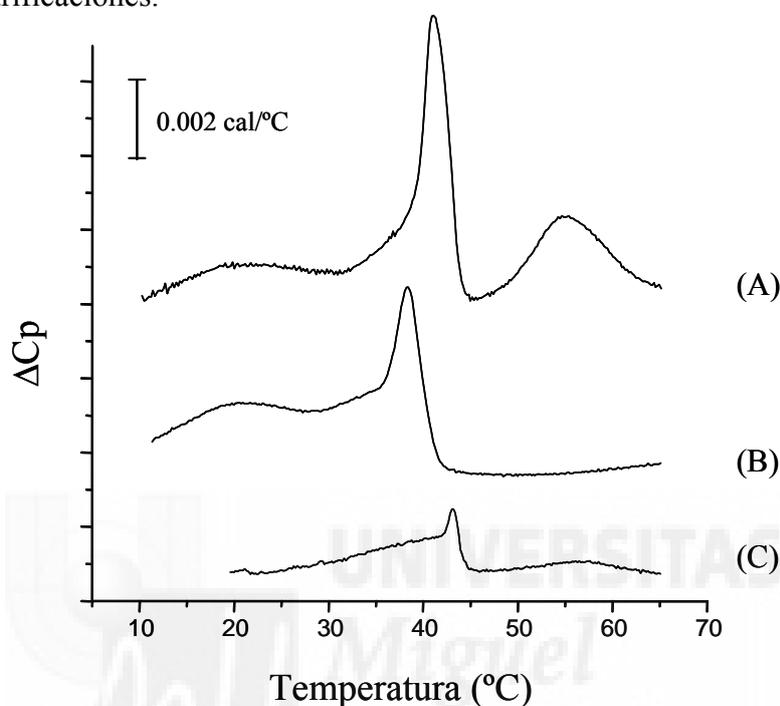


Figura 8. DSC de muestras con dominio a diferentes relaciones fosfolípido/proteína. En la figura se muestran los termogramas, (A) primero y (B) segundo, de muestras compuestas por DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) con AcChR, relación molar fosfolípido/proteína 564, una vez restada la línea base. También se incluye el primer termograma de una muestra idéntica a la anterior pero con una relación molar fosfolípido/proteína de 3500 (C). En todas las muestras la cantidad de cada lípido es la misma, con una concentración de DMPA final 10 mM, variando sólo la del AcChR. El tampón utilizado fue Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4.

Debido al gran gasto de proteína que supone realizar estos experimentos mediante DSC, se probaron otras relaciones fosfolípido-proteína pero con anisotropía de fluorescencia. En este caso, se usó la sonda *t*-PnA incorporada a matrices de DMPA:PC de huevo:Col (25:50:25 relación molar), puesto que esta sonda es capaz de detectar perfectamente el dominio de DMPA segregado por la proteína. Es de esperar que el cambio de anisotropía de fluorescencia que experimenta el *t*-PnA refleje la cantidad de lípido segregado, ya que la sonda estará repartida entre las dos fases lipídicas, la del dominio y la del resto de los lípidos. Por tanto, la anisotropía detectada será el promedio de la del *t*-PnA en cada una de las fases. Si hay una mayor fracción de lípido segregado en el dominio, también habrá una fracción mayor de sonda incluida en él, en relación a

la que hay en el resto de los lípidos, lo que ha de derivar en un mayor cambio de anisotropía con la temperatura y consecuentemente una mayor amplitud en la curva de anisotropía.

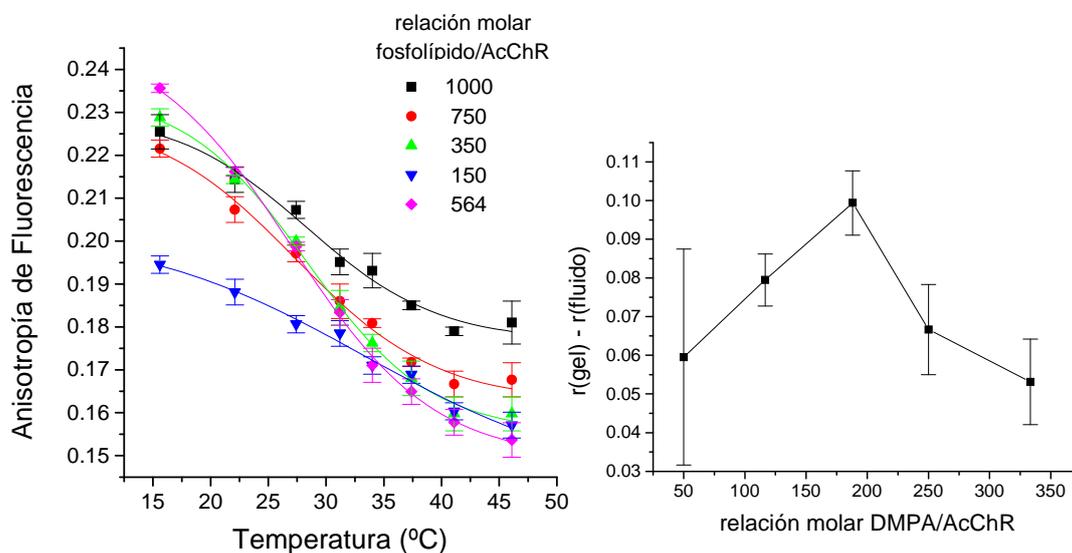


Figura 9. Anisotropía de fluorescencia en muestras con diferente relación fosfolípido/AcChR. En el **panel A** la anisotropía de fluorescencia del *t*-PnA se siguió con la temperatura en muestras de DMPA:PC de huevo:Col (25:50:25 relación molar) con AcChR a una relación molar fosfolípido/proteína variable, pero manteniendo la cantidad de lípido fija. También se muestran en esta figura los ajustes sigmoidales como trazas continuas. En el **panel B**, la amplitud de las curvas sigmoidales obtenidas por el ajuste de los datos de anisotropía de fluorescencia a este tipo de curva, que es aproximadamente la diferencia entre la anisotropía de la sonda en la fase gel del dominio y la fase fluida del mismo, se representa frente a la relación molar de DMPA/AcChR. Concentración final de DMPA en todas las muestras 0.12 mM. El tampón utilizado fue Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4. Los datos se presentan \pm s.e.

En la **figura 9A**, se puede observar que al variar la cantidad de proteína presente en las vesículas lipídicas, la amplitud de las curvas de anisotropía cambia. Así, a una relación molar fosfolípido-proteína de 1000, la curva da una pequeña disminución de anisotropía con la temperatura. Conforme aumentamos la cantidad de AcChR, la variación de la anisotropía es mayor hasta que llegamos a una relación molar fosfolípido/proteína de 564. A partir de este punto, una mayor adición del receptor da lugar a una disminución en la amplitud de la curva de anisotropía. Si se hace una representación de la amplitud de estas curvas, obtenido mediante el ajuste de las mismas a sigmoides, frente a la relación molar DMPA/AcChR, se obtiene un máximo a 190, que corresponde a 564 para la relación molar fosfolípido/AcChR (**figura 9B**). Esta sería la estequiometría del dominio, ya que en ese punto habría una segregación de todo el DMPA de la mezcla lipídica por parte de la proteína.

4.- Localización del dominio

4.1.-Estudios de transferencia de energía por resonancia

Puesto que los espectros de absorción de las sondas DPH y *t*-PnA solapan con el espectro de emisión de los triptófanos de la proteína, es posible usar estas sondas como aceptores de la transferencia de energía de los triptófanos del AcChR para investigar la distribución de estas sondas fluorescentes alrededor del receptor, y así poder localizar el dominio lipídico segregado por esta proteína (ver apartado 5, “Transferencia de energía por resonancia” en el Apéndice). Se realizaron experimentos de RET con vesículas de DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) en presencia de AcChR a una relación molar fosfolípido/proteína de 564, para la que hay máxima segregación de lípidos por parte del AcChR. La temperatura en este caso fue de 20 °C, con lo que los lípidos en el dominio estarán en fase gel según los experimentos de anisotropía de fluorescencia, situándose entonces la sonda *t*-PnA mayoritariamente en el mismo. De esta manera, la localización de esta sonda, nos dará la del propio dominio.

El primer paso seguido fue el de obtener los espectros de emisión de los triptófanos de la proteína, así como los de absorción de las sondas que se utilizarán como aceptores, *t*-PnA y DPH. Como se puede observar en la **figura 10**, hay un solapamiento importante de la emisión del donador (Trp) con la de los aceptores, condición indispensable para que se produzca la transferencia de energía. Con estos espectros, se calculó el valor de J , la integral de solapamiento, asumiendo que el índice de refracción del medio es 1.33 (Valenzuela et al. 1994) y que κ^2 es 2/3. Suponiendo que el rendimiento cuántico del donador (Trp) es de 0.29 (Antollini et al. 1996), se pudo calcular R_0 de cada par aceptor-donador (**tabla 2**).

Una vez realizados estos cálculos previos, se realizaron los experimentos de transferencia de energía con las dos sondas, *t*-PnA y DPH como aceptores y los triptófanos del AcChR como donadores. En el caso de que se produzca la transferencia de energía, al excitar a la longitud de onda del donador una muestra que contenga una cantidad fija del mismo, conforme se vayan añadiendo cantidades crecientes de aceptor, deberá disminuir la emisión del donador e ir aumentando la del aceptor, pese a que no se está excitando directamente a éste último. Efectivamente, esto es lo que tiene lugar según se puede observar en la **figura 11**.

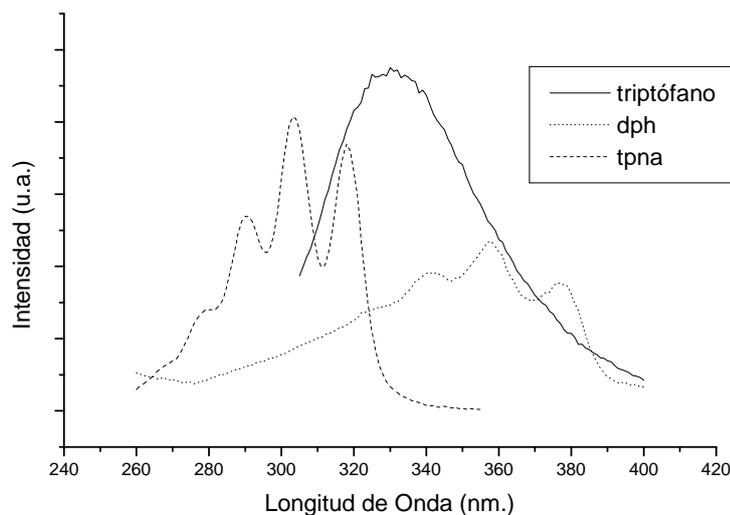


Figura 10. Espectros de emisión y absorción para el cálculo de R_o . En la figura se muestran los espectros de absorción de las sondas *t*-PnA y DPH en vesículas lipídicas, así como el espectro de emisión de los triptófanos del AcChR reconstituido en vesículas lipídicas de composición controlada. El tampón utilizado fue Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4

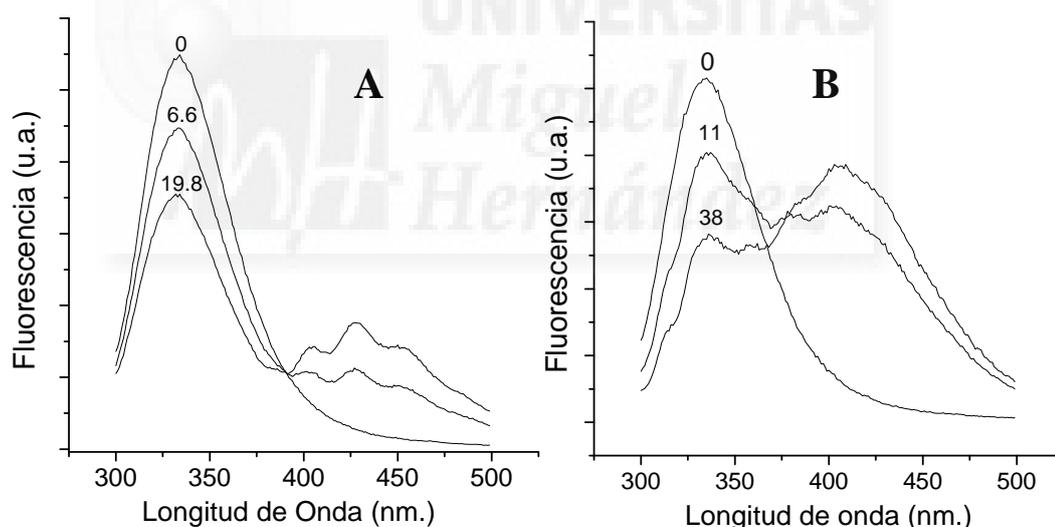


Figura 11. Espectros de emisión del AcChR en presencia de sonda aceptora. Se presentan los espectros de emisión de triptófano del AcChR con cantidades crecientes de sonda aceptora, DPH en el **panel A** y *t*-PnA en el **panel B**. La longitud de onda de excitación es 280 nm. Para cada espectro se indica la relación molar de la sonda aceptora respecto al AcChR.

A la hora de analizar los datos de transferencia de energía se recurre al modelo de Gutiérrez-Merino en su versión específica para el AcChR y para sistemas de dos dimensiones, como es una membrana lipídica (ver apartado 5.1 “Análisis de los datos de transferencia de energía por resonancia” en el Apéndice). Este modelo cuenta con

tres parámetros, r , H y K_r , por lo que se ha de fijar alguno de ellos para calcular el resto. Por esa razón se utilizó la sonda DPH para calcular r , la mínima distancia entre donador y aceptor, ya que esta sonda se reparte igualmente en fases fluidas y tipo gel, como las que tendríamos por debajo de la temperatura de transición del dominio, que es de unos 35 °C (los experimentos se llevaron a cabo a 20 °C). Por tanto, para esta sonda podemos suponer una distribución al azar alrededor de la proteína y de este modo fijar K_r a 1. Comparando los datos experimentales con las curvas teóricas generadas a partir del modelo de Gutiérrez-Merino con diferentes valores de r y H , se pueden obtener un óptimo ajuste para un valor de r de 30 Å y uno de H igual a 10 Å (**figura 12**). Tanto el DPH como el t -PnA dan parámetros de fluidez muy parecidos cuando se encuentran en una misma matriz lipídica, por lo que se les supone una localización en membrana similar. Por ello, se fijaron r y H para el t -PnA a los mismos valores anteriormente obtenidos con el DPH. Habiendo fijado estos parámetros, se pudo obtener un K_r para la sonda t -PnA igual a 0.6 buscando el mejor ajuste de los puntos experimentales a las curvas teóricas obtenidas para diferentes valores de K_r (**figura 12**). Esto significa que el t -PnA está distribuido preferentemente en las proximidades de la proteína. H se fijó a 10 Å en todas las curvas generadas por el modelo para las dos sondas porque todos los datos experimentales dieron un mejor ajuste para ese valor. Esta distancia también ha sido utilizada en trabajos anteriores de transferencia de energía aplicando el modelo de Gutiérrez-Merino desde el triptófano del AcChR a la sonda Laurdan embebida en la membrana (Antollini et al., 1996).

La **tabla 2** resume los datos obtenidos de los experimentos de RET.

Tabla 2. Datos obtenidos en los experimentos de R.E.T.

Los valores calculados se acompañan de la desviación estándar, siendo $n \geq 3$

Muestra	Sonda	r^a (Å)	R_0^b (Å)	K_r^c	H^d (Å)
DMPA:PC:Col	t -PnA	30	26.8±0.7	0.6±0.1	10
DMPA:PC:Col	DPH	30±2	32.7±0.2	1	10
DMPC:PC:Col	t -PnA	30	26.8±0.7	1±0.1	10

(a) Distancia mínima entre el donador y el aceptor

(b) Radio de Förster para cada sonda, calculado como se describe en el texto

(c) K_r es la constante aparente de disociación para el aceptor por los lípidos en la región anular.

(d) Distancia entre los planos en que se encuentran el donador y el aceptor.

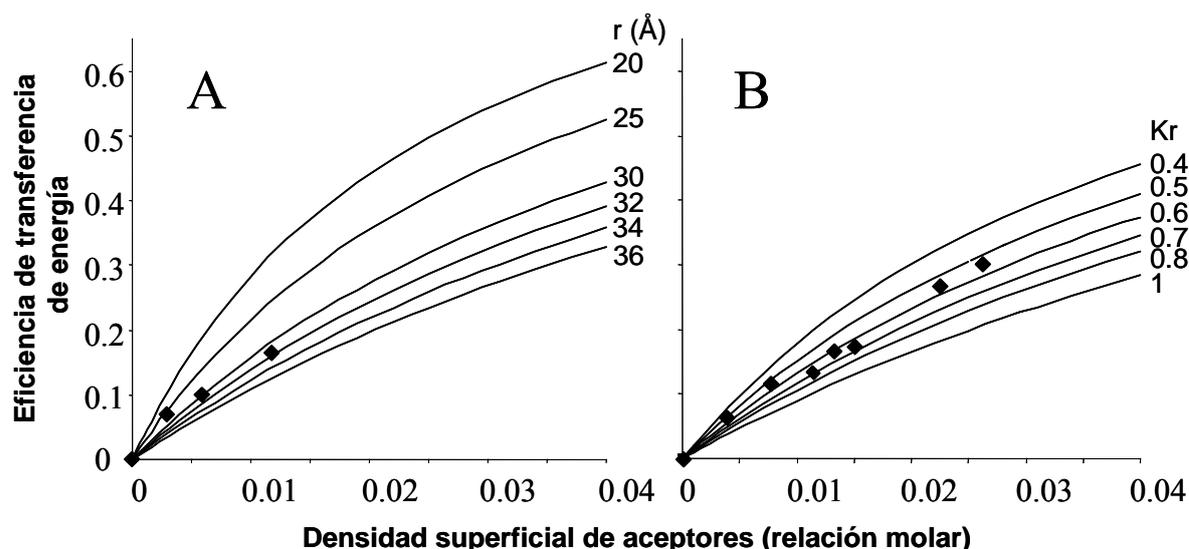


Figura 12. Aplicación del modelo de Gutiérrez-Merino a los datos de R.E.T. Los datos experimentales obtenidos en los experimentos de RET con las sondas DPH, **panel A** y *t*-PnA, **panel B**, en muestras de DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) con AcChR, relación molar fosfolípido/proteína 564, se representan junto a las curvas generadas con el modelo de Gutiérrez-Merino. En el caso del DPH, se fija K_r a 1 y H a 10 Å, variando r , mientras que para la sonda *t*-PnA, se fija r a 30 Å y H a 10 Å, variando K_r . El tampón utilizado fue Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4

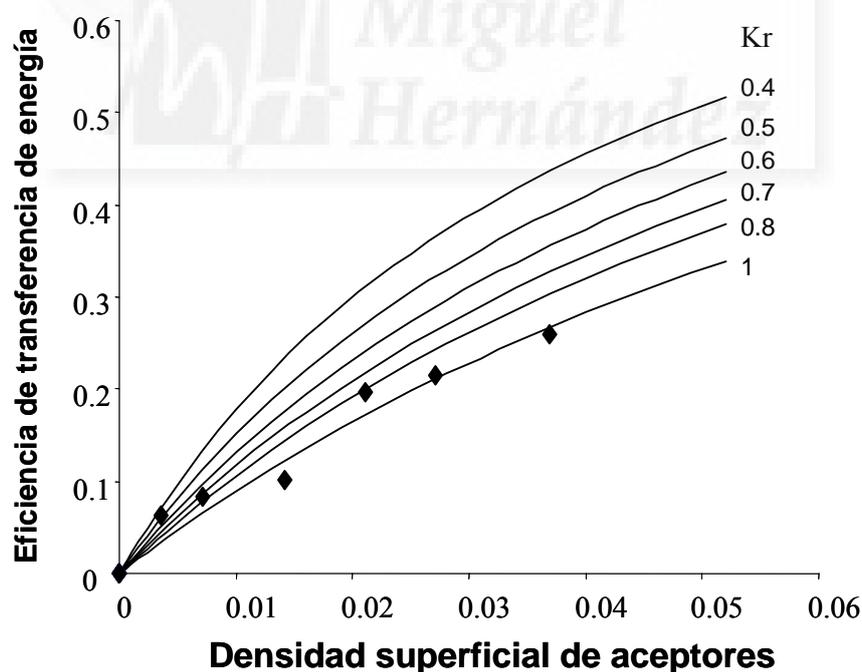


Figura 13. RET en vesículas sin dominio. En esta figura se muestran los datos obtenidos en experimentos de RET con vesículas de DMPC:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) y AcChR, relación molar fosfolípido/proteína 564, con la sonda *t*-PnA como aceptor del triptófano del AcChR. Los datos experimentales se representan junto a las curvas teóricas obtenidas mediante el modelo de Gutiérrez-Merino habiendo fijado H a 10 Å y r a 30 Å, y dejando variable K_r . El tampón de las muestras es Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4.

Se repitieron los experimentos con la sonda *t*-PnA, pero con muestras compuestas por DMPC:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) con AcChR, relación molar fosfolípido/proteína 564, en las que no se ha detectado dominio con las diferentes técnicas ya comentadas a lo largo de esta memoria. Por tanto, éste sería un control negativo para los experimentos de RET. Los resultados obtenidos fijando r a 30 Å y H a 10 Å resultan en un K_r de 1, como es de esperar en una muestra en la que no hay dominio alrededor de la proteína, por lo que el *t*-PnA ha de estar distribuido al azar alrededor del AcChR (**figura 13**).

4.2.- Estudios de FRAP

La técnica de F.R.A.P. (recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueo), se ha utilizado frecuentemente para investigar la organización y dinámica de membranas, con un gran potencial para identificar dominios lipídicos y determinar los coeficientes de difusión de los lípidos y proteínas presentes (Cezanne et al., 1999; Salome et al., 1998; Vaz et al., 1989; Vaz, 1994). Por tanto, se trata de una herramienta con la que se podría obtener información del dominio segregado por el AcChR, ya que éste, por debajo de su T_m , estaría en una fase tipo gel en la que la difusión podría estar dificultada. Para poder medir la difusión del AcChR se marcó esta proteína con isotiocianato de fluoresceína (FITC), una vez reconstituida en DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) como se detalla en el capítulo de *Materiales y Métodos*. Con esta muestra se realizaron experimentos de FRAP a 20 °C, es decir, por debajo de la T_m del dominio lipídico segregado por el AcChR, obteniéndose la consiguiente curva de recuperación de fluorescencia (**figura 14**).

Del ajuste de estos datos a la ecuación de Soumpasis (Soumpasis, 1983), se obtienen dos parámetros: por un lado, el porcentaje de recuperación de fluorescencia y por otro el coeficiente de difusión. El primero resultó ser de un 72.2 %, lo que significa que hay un 27.8% de proteína inmovilizada en la muestra, para la escala de tiempos de esta técnica. La difusión resultó ser 10^{-8} cm²/s, valor algo menor, aunque del mismo orden, que el obtenido para esta misma proteína en distintas membranas lipídicas en fase líquido-cristalina (Criado et al., 1982). Estos resultados indican que habría una población mayoritaria de AcChR que difundiría sin problemas por la bicapa lipídica, pero que también habría una importante fracción de AcChR que no difundiría como lo haría en una membrana lipídica fluida, es decir, se encontrarían en una fase en la que la difusión estaría más impedida.

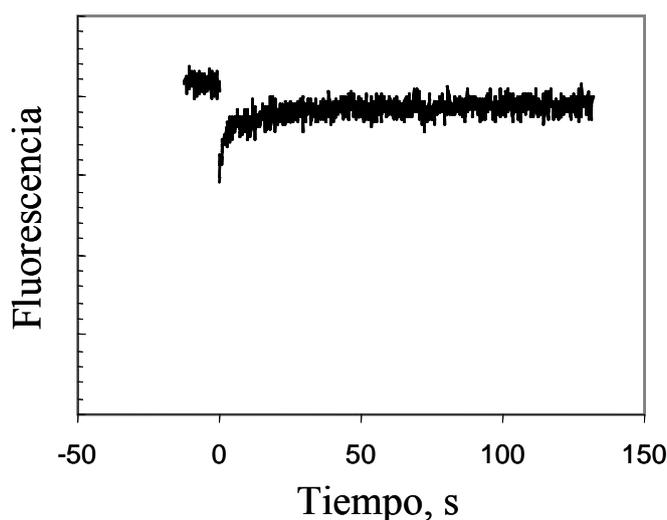


Figura 14. Curva de recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueo. En la figura se sigue la fluorescencia que proviene del isotiocianato de fluoresceína con el que se ha marcado AcChR reconstituido en matrices lipídicas de DMPA:PC huevo:colesterol (relación molar 25:50:25). La relación en peso fosfolípido/AcChR es de 150. El tiempo cero corresponde con el momento en que se hace el disparo con láser que provoca el blanqueo de la fluorescencia y su posterior recuperación.

5.- El DMPA en el dominio no se comporta como el DMPA puro

En un intento de hacer una mejor caracterización del dominio, se pretendió establecer cuál es el comportamiento del DMPA segregado en el dominio en relación al DMPA puro.

La transición de fase del DMPA es muy sensible al pH del medio, puesto que este fosfolípido contiene un grupo fosfato ionizable con pKs de 4 y 8.5 (van Dijck et al., 1978). De hecho, al aumentar el pH de 5 a 9, la temperatura de transición del DMPA disminuye sigmoidalmente, con un punto de inflexión a pH 8.5, valor que coincide con su segundo pK_a. Esto se debe a que la presencia de una mayor carga negativa en la cabeza polar desestabiliza la matriz lipídica y por tanto disminuye su T_m. (Eibl y Blume, 1979; Pott et al., 1995). Por todo ello estudiamos en un primer paso el efecto del pH sobre el dominio. En la **figura 15** se observan las curvas de calorimetría obtenidas con muestras de AcChR reconstituido en vesículas de DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) a una relación molar fosfolípido-proteína 3500, para las cuales se había detectado el dominio mediante esta misma técnica, a diferentes pHs. De este experimento se puede deducir que se produce un leve aumento de la T_m y una disminución de la entalpía al subir el pH. Sin embargo, en el caso del DMPA puro (**figura 16**), al contrario que el DMPA del dominio, la temperatura de transición disminuye conforme lo hace el pH.

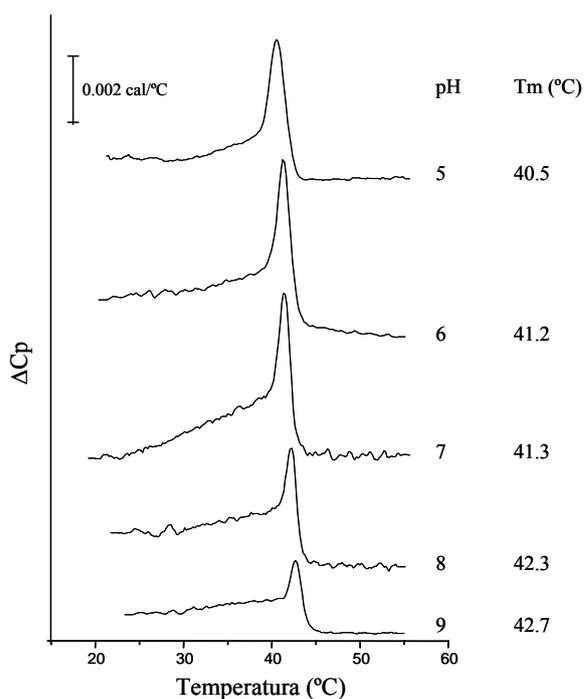


Figura 15. DSC a diferentes pHs.

Termogramas de muestras compuestas por DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) con AcChR, relación molar fosfolípido/proteína 3500. En la figura se indica el pH al que está cada muestra y la T_m obtenida. Cada termograma corresponde al segundo barrido y ha sido corregido restando la línea base correspondiente. Concentración DMPA final, 10 mM. El tampón que se utiliza para todos los pHs se compone de: NaCl 100 mM, EDTA 0.1 mM, MOPS 10 mM, CAPS 10 mM, CH₃COONa 10 mM, NaN₃ 0.02%, debido a su amplio rango de tamponamiento.

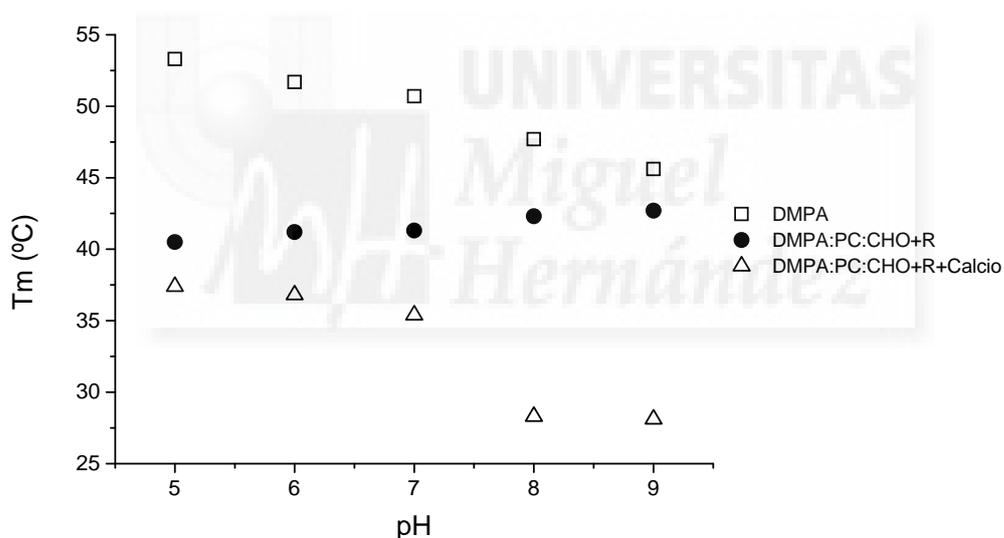


Figura 16. Variación de la T_m con el pH. Se representa en esta figura la T_m obtenida a partir de los termogramas de DSC de muestras compuestas por DMPA puro o por mezclas de DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) con AcChR, relación molar fosfolípido/proteína 3500, frente al pH en el que se encuentran. Los resultados en presencia de calcio también se muestran.

Otra característica de las matrices del DMPA puro es su interacción con el calcio, el cual se une a este fosfolípido provocando, cuando está en exceso, la desorganización de las bicapas y la conversión en unas estructuras cilíndricas lamelares altamente empaquetadas que precipitan en agua (Verkleij et al., 1979; Van Dijck et al.,

1978). Con el objeto de comprobar si el DMPA presente en el dominio conserva estas propiedades, se realizaron estudios de DSC con muestras de AcChR reconstituido en vesículas de DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) a una relación molar fosfolípido-proteína 3500 para las que el dominio es detectado perfectamente mediante esta técnica. En paralelo y como comparación se hicieron los mismos estudios con DMPA puro. La adición de calcio en una relación 3 a 1 respecto al DMPA en vesículas compuestas sólo por este fosfolípido, a cualquiera de los pHs probados, provoca la aparición de un precipitado blanco y elimina por completo la transición de fase, lo cual no ocurre con el dominio de DMPA segregado por la proteína con la misma relación DMPA:calcio (**figura 17**). Una posibilidad para explicar el poco efecto del calcio sería un cambio en el estado de ionización del DMPA en el dominio que alterara la interacción con el catión. Por ello se repitieron los experimentos a diferentes pH, resultados que quedan reflejados en las **figuras 16 y 17**.

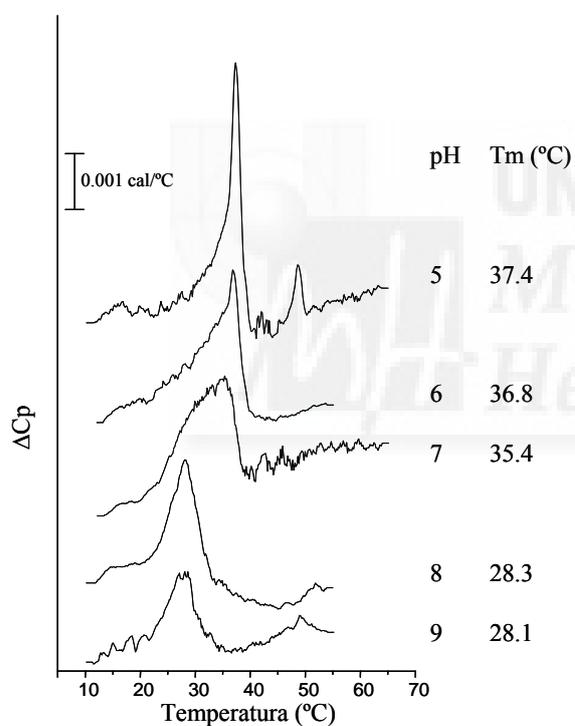


Figura 17. DSC en presencia de calcio. Termogramas de muestras compuestas por DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) con AcChR, relación molar fosfolípido/proteína 3500, a diferentes pHs y en presencia de CaCl_2 30 mM. Junto a cada barrido se indica el pH y T_m de la muestra. Concentración DMPA final 10 mM. El tampón utilizado en todos los casos es el mismo que el descrito en la figura 15.

Una mayor adición de calcio, llegando a una relación DMPA:Calcio de 9 a 1 sí elimina la transición de fase del dominio a cualquiera de los pHs probados.

Otro factor que pudiera alterar la interacción del DMPA con el calcio es la presencia de colesterol o PC de huevo que pudieran segregarse junto al DMPA en el dominio (ver apartado 2 de este capítulo). Por eso se realizaron experimentos con vesículas sin AcChR, compuestas por DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 90:10:20), que dan un cambio de fase en DSC similar al del DMPA segregado por la proteína (ver apartado 2, figura 7 de este capítulo). Según los resultados que muestra la

figura 18, el calcio en estas muestras sí elimina la transición de fase, por lo que ha de ser la presencia del AcChR lo que perturba la interacción del calcio con el DMPA.

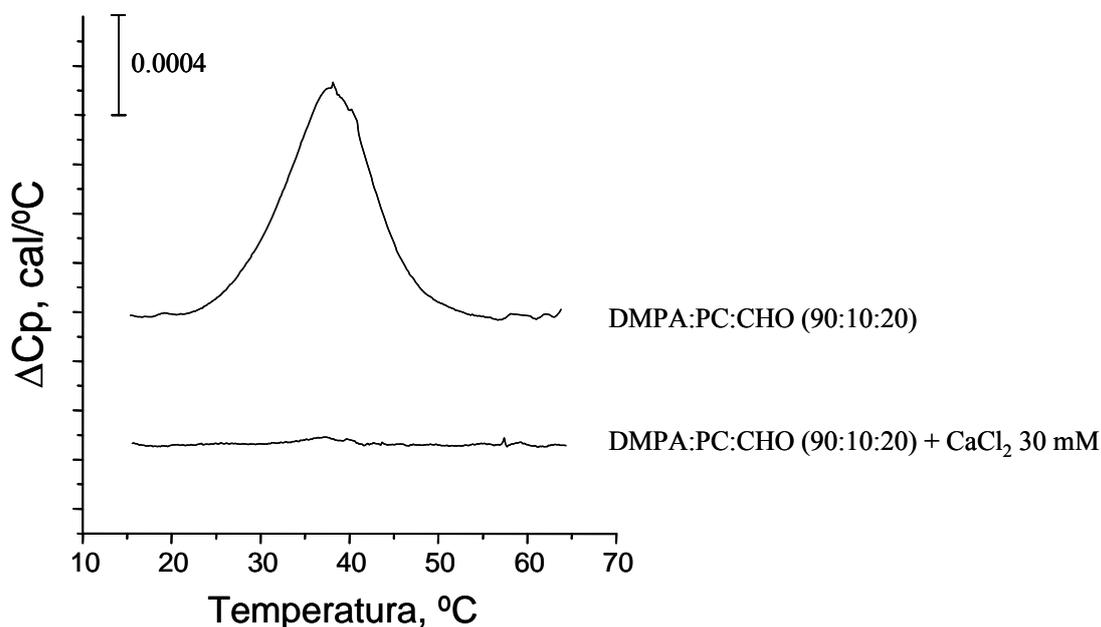


Figura 18. Efecto del colesterol sobre la interacción DMPA-Calcio. Termogramas de vesículas compuestas por DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 90:10:20) en presencia o ausencia de CaCl₂ 30 mM. La concentración final de DMPA es 10 mM y el tampón utilizado, Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4.

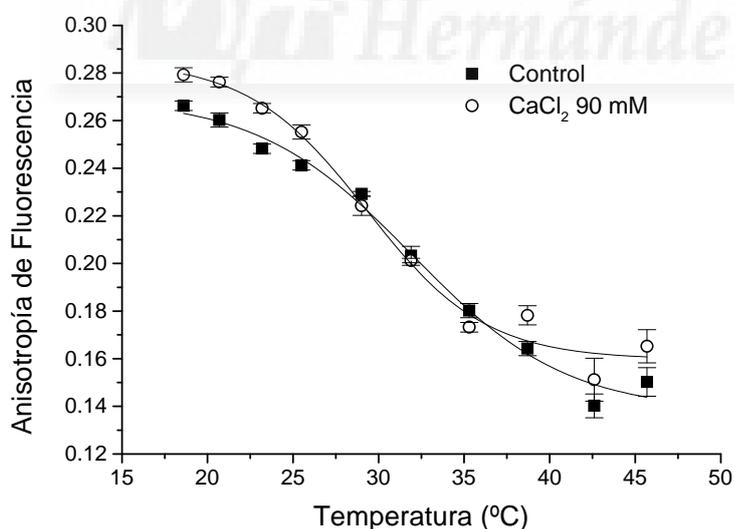


Figura 19. Anisotropía de fluorescencia de vesículas en presencia de calcio. La anisotropía de la sonda *t*-PnA en muestras de DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) con AcChR, relación molar fosfolípido/proteína 564, se midió con la temperatura en presencia o no de CaCl₂ 90 mM final. Los ajustes a curvas sigmoidales de los datos se muestran como trazas continuas. La concentración final de DMPA es 10 mM. El tampón utilizado es Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4. Los datos se presentan \pm s.e.

Experimentos similares se realizaron midiendo la anisotropía de fluorescencia de la sonda *t*-PnA en muestras de DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) con AcChR, relación molar fosfolípido/proteína 564. En este caso, se añadió calcio en exceso, hasta un máximo de 90 mM, lo que supone una relación molar Calcio/DMPA de 250, sin que se elimine la transición de fase típica del dominio de DMPA segregado por la proteína (**figura 19**).

De todos estos experimentos se puede concluir que la desprotonación del DMPA y su unión a calcio están comprometidas, posiblemente por la interacción del mismo con el AcChR para formar el dominio.

Según los datos obtenidos con el pH y calcio, el estado iónico del PA parece alterado cuando se encuentra en el dominio. Por ello, se realizaron experimentos de FT-IR en los que se puede seguir la carga que presenta este fosfolípido a través de las vibraciones provenientes del grupo fosfato. El PA es el único lípido de las muestras capaz de pasar de la forma monoaniónica del fosfato a la dianiónica, con lo que no habrán interferencias provenientes de otros lípidos. En la **figura 20 A** se muestran los cambios con la temperatura de la relación de áreas de las bandas de absorción con máximos a 980 y 1180 cm^{-1} , que corresponden a las vibraciones de tensión de las formas dianiónicas y monoaniónicas respectivamente del grupo fosfato del PA (Bhushan y McNamee, 1993). En las vesículas de DMPA:PC de huevo:Col (25:50:25 relación molar) sin proteína y pH 7.4, el valor de esta relación de áreas oscila entre 0.13 y 0.17. Sin embargo, en presencia del AcChR (relación molar lípido-proteína 3500), reconstituido en estas mismas vesículas produce que el valor de la relación de áreas descienda hasta aproximadamente 0.06, sugiriendo que a pH neutro, la proteína cambia el equilibrio entre las formas desprotonadas del grupo fosfato del DMPA, favoreciendo y estabilizando la especie monoaniónica. Con el fin de comprobar si el cambio observado está específicamente relacionado con un desplazamiento en el equilibrio de las formas desprotonadas del DMPA, inducido por el AcChR, también se procesaron muestras preparadas con DMPC en lugar de DMPA como control (**figura 20 B**). En este caso la proteína no causa ninguna alteración en la relación de áreas de las bandas a 980 y 1180 cm^{-1} . La relación de áreas para las muestras con DMPC debería de ser cero ya que no hay fosfato en forma dianiónica, pero no es así porque en esta zona del espectro hay pequeñas contribuciones de vibraciones del grupo fosfato esterificado y del esqueleto peptídico del AcChR (Bhushan y McNamee, 1993). Sin embargo esto no invalida los resultados ya que el efecto del receptor sólo aparece en las vesículas con DMPA, por lo que la intensidad de estas vibraciones no debe ser relevante frente a la del fosfato.

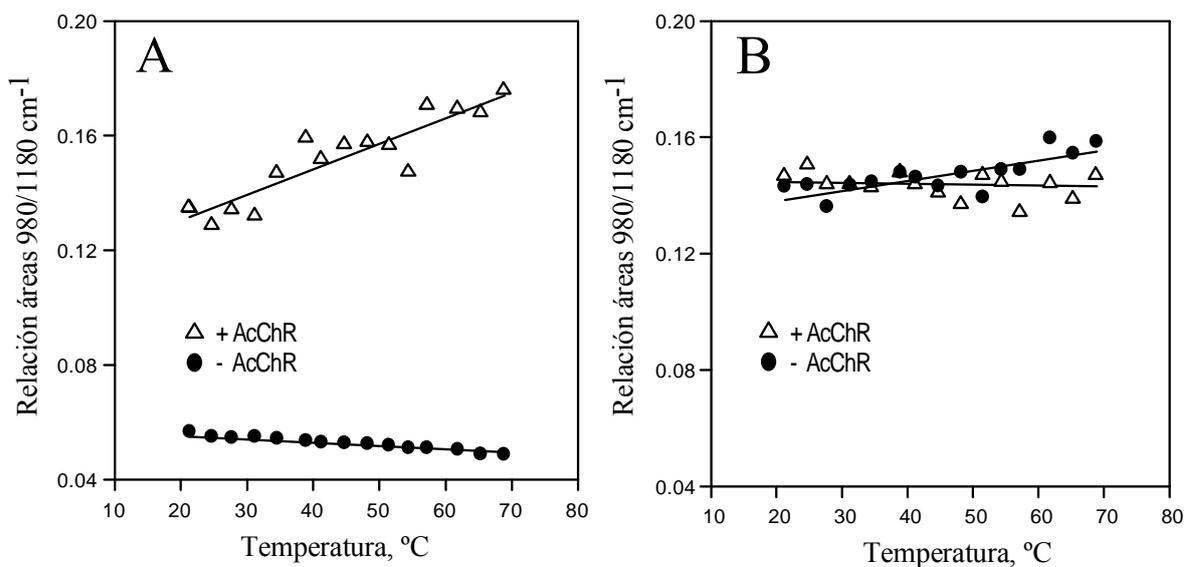


Figura 20. FT-IR de los grupos fosfato. Se muestra la variación de la relación de áreas de las bandas a 980 y 1180 cm^{-1} de los espectros de FT-IR tomados en agua, correspondientes a las formas dianiónicas y monoaniónicas del grupo fosfato, con la temperatura. **Panel A:** DMPA:PC de huevo:Col (25:50:25 relación molar) con y sin AcChR. **Panel B:** DMPC:PC:Col (25:50:25 relación molar) con y sin AcChR. La relación molar fosfolípido/AcChR cuando la proteína está presente es 3500. El tampón usado es Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4.

Otro grupo funcional presente en los fosfolípidos y que se puede seguir mediante espectroscopia de infrarrojo es el carbonilo ($\text{C}=\text{O}$). En estas moléculas está situado en la interfase agua-lípido y su vibración es sensible a la hidratación del mismo, de modo que es posible evaluar la hidratación de una bicapa lipídica mediante FT-IR (Désormeaux et al., 1992; Laroche et al., 1991; Blume et al., 1988). Asimismo, se ha descrito en la bibliografía que existe una relación entre la hidratación y el pK_a de los fosfolípidos en una membrana (Sankaram et al., 1990). Por todas estas razones, es interesante evaluar el efecto del AcChR sobre la hidratación de la membrana en que se reconstituye como posible explicación al cambio del pK_a que induce en el DMPA segregado, fenómeno que se ha detectado en este tipo de muestras como ya se ha expuesto anteriormente en este capítulo. En la **figura 21** se muestran los resultados del estudio mediante FT-IR de la banda del grupo carbonilo en vesículas compuestas por un 25% de DMPA, 50% PC de huevo y 25% colesterol (porcentajes en relación molar) con o sin AcChR y a dos temperaturas, 23°C y 70 °C. La banda observada presenta en todos los caso al menos dos componentes, una centrada a 1744 y otra a 1725 cm^{-1} , asignadas en la literatura al carbonilo deshidratado e hidratado respectivamente, y que se distinguen mucho mejor cuando el espectro es deconvuelto (**figura 21, panel B**). Se puede observar que la presencia del AcChR provoca la deshidratación de la membrana a las dos temperaturas, si bien no se puede asignar el cambio únicamente al DMPA ya

que la vibración del grupo carbonilo procede de todos los fosfolípidos presentes en las vesículas, es decir, del DMPA y del PC de huevo.

Los cambios de fase en los fosfolípidos pueden provocar alteraciones en la hidratación de los mismos, estando más hidratados en fase líquido-cristalino que en fase gel (Désormeaux et al., 1992). El dominio de DMPA segregado por parte del AcChR se encontraría en fase gel a 23 °C frente a la fase fluida de las mismas vesículas sin la proteína lo que podría explicar el efecto de deshidratación del AcChR. Sin embargo a 70 °C, temperatura por encima de la transición de fase del DMPA segregado por el AcChR, la muestra con proteína sigue estando más deshidratada. Por tanto, han de existir determinadas interacciones lípido-proteína al margen de los cambios de fase que provoquen estos cambios.

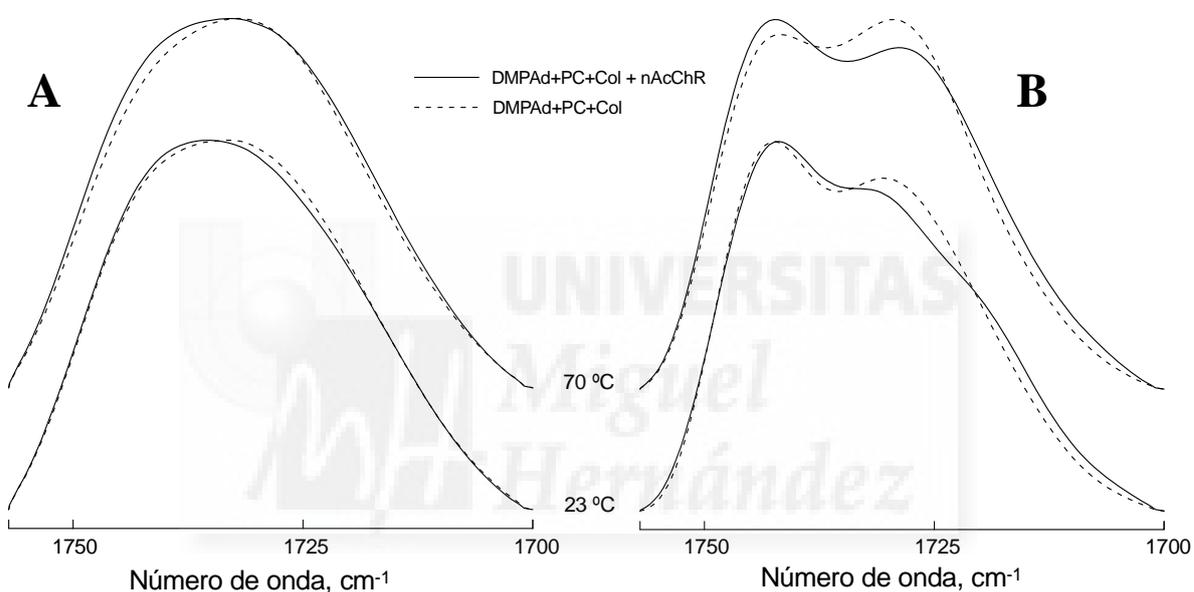


Figura 21. FT-IR del grupo carbonilo. La banda asignada al grupo carbonilo en es espectro de infrarrojo fue seguida a 23 y 70 °C en muestras de DMPA:PC de huevo: Col (relación molar 25.50:25) con o sin AcChR. En el **panel A** se muestra la banda original y en el **panel B** la banda deconvuelta. La relación molar fosfolípido/AcChR es de 3500 cuando la proteína está presente. El tampón utilizado es Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4. Las muestras fueron sometidas a un intercambio H₂O por D₂O antes de ser analizadas.

6.- Estabilidad y dinámica del dominio: interacciones lípido-proteína

Hasta este punto se ha establecido la localización, posible composición y estequiometría del dominio. También se ha comprobado el diferente estado iónico del PA en el dominio, pero ¿cuáles son las interacciones lípido-proteína que originan y mantienen este dominio?. Los experimentos a diferentes pHs comentados en el apartado anterior sirven para arrojar luz sobre esta cuestión. El hecho de que el AcChR segregue

el dominio de PA sin casi ninguna perturbación en un intervalo de pH en el que este fosfolípido habría de cambiar su estado iónico nos indica que, o las fuerzas electrostáticas no son esenciales para que este fenómeno se produzca, o que el PA en el dominio esté interaccionando con el AcChR de tal manera que no le afecten estos cambios de pH. Esta última opción está apoyada por los datos de FT-IR del grupo fosfato del DMPA como se ha comentado en el apartado anterior.

A fin de seguir profundizando en esta cuestión, se realizaron experimentos de anisotropía de fluorescencia a pH más básico que los hasta entonces probados por DSC y a alta fuerza iónica (**figura 22**)

Por la disminución en la amplitud de la curva de anisotropía, se puede deducir que un pH o fuerza iónica altos desestabilizan el dominio aunque no logran eliminarlo. Estos resultados son similares a los de DSC a pH 9 en los que hay una ligera disminución de la entalpía de la transición de fase, y parecen indicar que las fuerzas electrostáticas no son las únicas que participan en las interacciones lípido-proteína que mantienen la segregación del dominio.

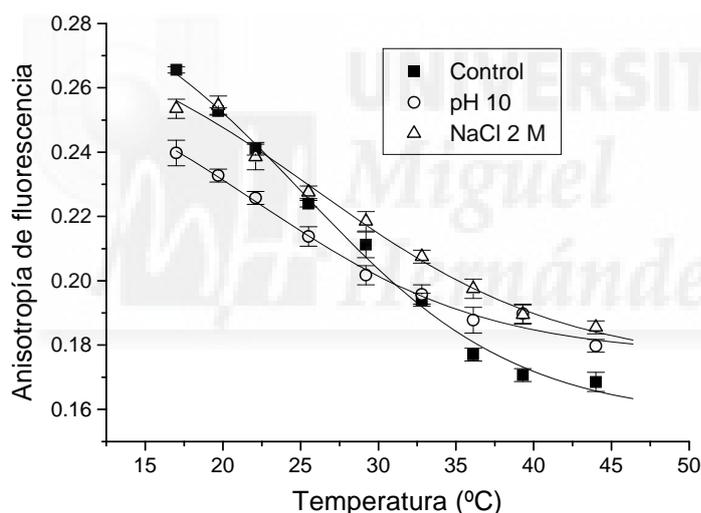


Figura 22 Anisotropía de fluorescencia en condiciones extremas. El pH o la concentración de NaCl se varió hasta 10 (**pH 10**) o 2 M (**NaCl 2 M**) respectivamente, en muestras de AcChR reconstituido en DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) a una relación molar fosfolípido/proteína 564, antes de añadir la sonda *t*-PnA para realizar el experimento. Los datos se presentan \pm s.e.

La reconstitución de la proteína en matrices lipídicas con fosfolípidos distintos al PA se realizó para encontrar alguna propiedad que explicase el porqué el AcChR segrega un dominio de un determinado lípido del resto de componentes en una matriz de composición compleja. Las curvas calorimétricas obtenidas en las matrices probadas: DMPS:PC de huevo:Col, DMPG:PC de huevo:Col y DMPA:PC de huevo:Col, todas ellas a una relación molar 25:50:25, conteniendo AcChR a una relación molar

fosfolípido:proteína de 3500, nos indican que el fenómeno de la segregación es exclusivo del DMPA (**figura 23**). Todos estos fosfolípidos tienen las mismas cadenas acílicas (miristoilos), carga negativa a pH 7.4, y además a este pH sus transiciones de fase están en el rango de temperaturas que se ha utilizado en este estudio (23 °C para DMPG, 35 °C para DMPS y 50 °C para DMPA, catálogo de Avanti Polar Lipids). Por tanto, estos fosfolípidos sólo se distinguen en la naturaleza de su grupo polar. También se incluye en el experimento un fosfolípido sin carga neta como es el DMPC (T_m de 23°C), para el que tampoco se encuentra ningún cambio de fase, indicativo de la ausencia de una segregación del mismo.

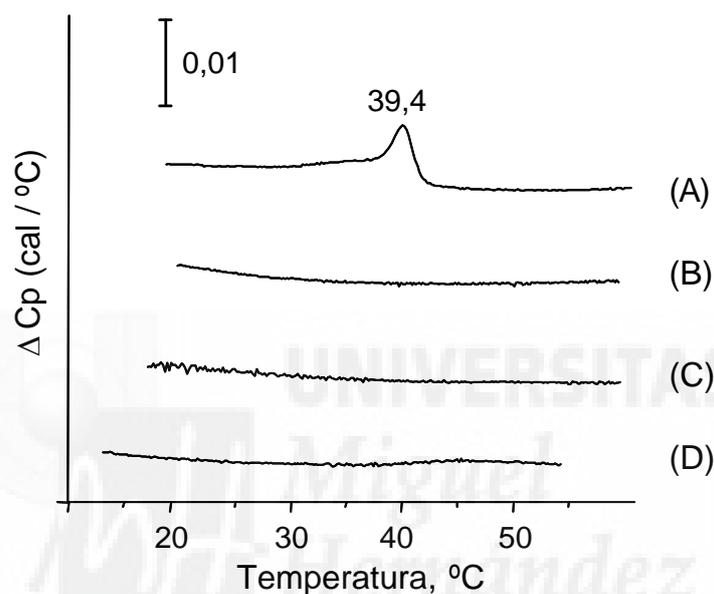


Figura 23. Termogramas de vesículas lipídicas de diferente composición.

Muestras compuestas por un fosfolípido sintético dimiristoilado a una concentración 10 mM final (DMPA (A), DMPG (B), DMPS (C) o DMPC (D)):PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) con AcChR, relación molar fosfolípido/proteína 3500, se someten a experimentos de DSC, obteniéndose los correspondientes termogramas tras restar la línea base correspondiente. El tampón utilizado fue Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4.

Según los datos obtenidos mediante transferencia de energía, el dominio de PA segregado por el AcChR está localizado alrededor de la proteína, por lo que ha de haber una interacción directa entre algunos de los aminoácidos del AcChR y este fosfolípido. Por tanto, un cambio conformacional del receptor, al alterar su estructura terciaria, podría influir en el proceso de segregación. Si esto fuera así, se podrían obtener datos de los residuos que intervienen en la segregación del dominio, que serían aquellos que varían su posición con el cambio conformacional. Con ese objetivo, se llevaron a cabo experimentos con un agonista como la carbamilcolina que provoca, tras una exposición continua frente al AcChR, la desensibilización del mismo, que a su vez conlleva un cambio conformacional de al menos la estructura terciaria de la proteína (ver

Introducción). Los resultados obtenidos implican una nula dependencia de la segregación del dominio con el cambio conformacional asociado a la desensibilización de la proteína (**figura 24**), ya que la presencia de este agonista apenas perturba el cambio de fase del dominio.

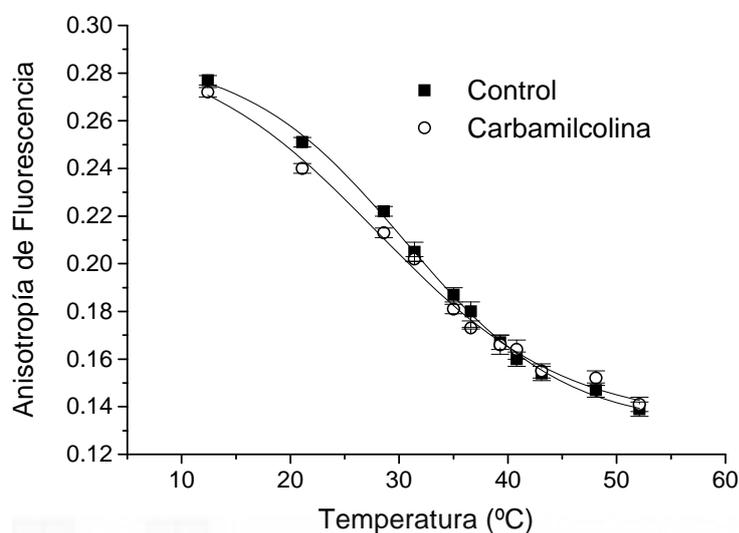


Figura 24. Anisotropía de fluorescencia en presencia de agonista. La anisotropía de fluorescencia del *t*-PnA en vesículas de DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) con AcChR, relación molar fosfolípido/proteína 564, se siguió con la temperatura en presencia de carbamilcolina 1 mM final. La muestra control es idéntica a la anterior pero sin añadir agonista. Los ajustes de los datos a curvas sigmoideas se muestran como trazos continuos. Concentración final DMPA 0.12 mM. El tampón utilizado fue Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4. Los datos se presentan \pm s.e.

El AcChR en este tipo de preparaciones está en forma dimérica, a través de un puente disulfuro entre las subunidades δ de dos moléculas de AcChR. Este hecho se ha comprobado mediante electroforesis en condiciones no reductoras (no mostrado). La relevancia de esta conformación en la estabilidad del dominio se evaluó con muestras sometidas a un agente reductor como es el DTT (**figura 25**). Aunque el mero proceso al que se somete al AcChR para obtenerlo en forma monomérica afecta a la cooperatividad de la transición de fase del DMPA segregado, como se observa en el experimento control en el que no se obtiene una sigmoide demasiado clara (**figura 25**), no hay ninguna diferencia entre la curva de anisotropía obtenida con esta muestra y la sometida a la reducción de los puentes disulfuro con DTT. En cualquier caso, el control se puede considerar válido ya que se sigue detectando la segregación de DMPA: el valor de anisotropía a baja temperatura de las muestras con AcChR es mucho mayor que sin la proteína. De este resultado queda claro que la formación del dominio es independiente de que el AcChR forme o no dímeros.

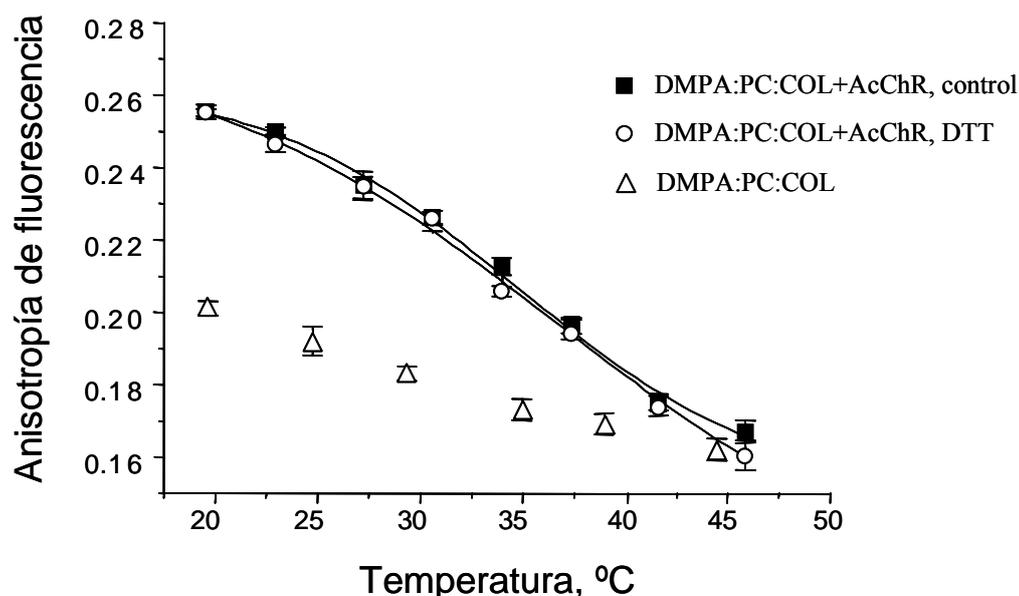


Figura 25. Anisotropía de fluorescencia del AcChR monomérico. El AcChR a una relación molar fosfolípido/proteína 564, reconstituido en matrices de DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) se procesó como se detalla en *Materiales y métodos* a fin de obtenerlo en forma monomérica. Las muestras control se realizaron en paralelo pero en ausencia de DTT en la incubación. Los ajustes a curvas sigmoideas de estos datos se muestran como trazas continuas. También se representan, para su comparación, los datos obtenidos con una muestra de la misma composición pero sin AcChR. La concentración de DMPA final es 0.12 mM. Los datos se presentan \pm s.e.

Otra manera de establecer qué factores están implicados en la formación del dominio es la de realizar una proteólisis parcial mediante proteinasa K del AcChR reconstituido en vesículas lipídicas que presenten segregación de dominio, es decir, de DMPA:PC de huevo:Col a una relación molar fosfolípido/proteína 564. En este proceso teóricamente se eliminan la totalidad de los segmentos extramembrana de la proteína, quedando solamente los transmembrana (Görne-Tschelnokow et al., 1994), por lo que se podrá averiguar si es la región transmembrana la única responsable del mantenimiento del dominio. En este caso deberían obtenerse péptidos de unos 2.3 kD. Sin embargo, no se pudieron reproducir los resultados publicados por Görne-Tschelnokow, como tampoco fueron capaces Méthot y Baenziger (Méthot y Baenziger, 1998). Aún así, el corte efectuado por la proteinasa K es bastante exhaustivo y rápido ya que en una hora el proceso ha finalizado (**figura 26**), obteniéndose mayoritariamente fragmentos de unos 5 kD. Comparado con los 50-60 kD que tienen las subunidades enteras, estos fragmentos son bastante pequeños aunque evidentemente han de contener tramos extramembrana, si bien posiblemente éstos hayan perdido gran parte de su estructura (**figura 26**). También se observa una banda muy marcada de entre 1 y 3 kD que pudiera contener los tramos transmembrana de 2.3 kD, aunque esta banda está mezclada con lípidos que avanzan con el frente por lo que no es posible asegurar si hay contenido proteico.

Tras esta proteólisis se comprueba si todavía es detectado el dominio mediante anisotropía de fluorescencia de la sonda *t*-PnA. En la **figura 27** se observa que, aunque el dominio queda desestabilizado, pues hay una pérdida de sigmoidicidad en la curva de anisotropía que significa una menor cooperatividad en la transición de fase, todavía está presente en este tipo de muestras, ya que la anisotropía de fluorescencia tiene valores elevados a bajas temperaturas si la comparamos con la matriz en ausencia de proteína. Este resultado indica que los tramos transmembrana son los más importantes para mantener la segregación del dominio.

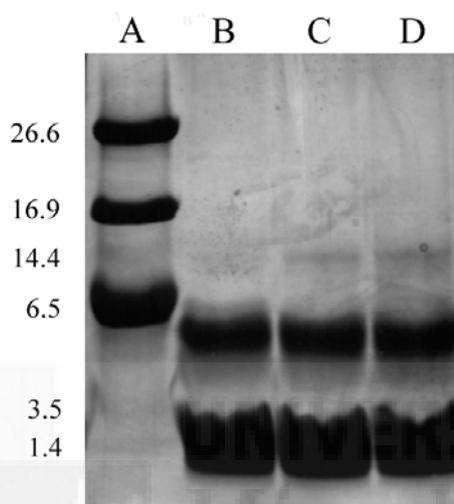


Figura 26. Electroforesis del AcChR proteolizado. SDS-PAGE en gel al 20% acrilamida en condiciones reductoras. Calles: A, patrón de pesos moleculares; B, AcChR tras una hora de digestión; C, AcChR tras dos horas de digestión; D, AcChR tras tres horas de digestión. A la izquierda del gel se muestran los pesos moleculares del patrón.

En todos los experimentos comentados anteriormente, el dominio está ya establecido antes de proceder a estudiar el efecto de determinadas sustancias o procesos sobre el mismo. Siempre cabe la posibilidad de que una vez formado el dominio, esté en un estado energético muy estable por lo que haya que vencer una barrera de activación muy grande para poder eliminarlo. Por ello, no podemos descartar que las fuerzas electrostáticas o que secuencias no transmembrana de la proteína sean clave para la formación del dominio pese a que los experimentos anteriormente comentados parezcan negar tal posibilidad. Una manera de poder comprobar diferentes condiciones experimentales durante la formación del dominio es proceder a la “reconstitución” de las muestras, proceso que parece no afectar a la actividad del AcChR (Jones et al., 1988).

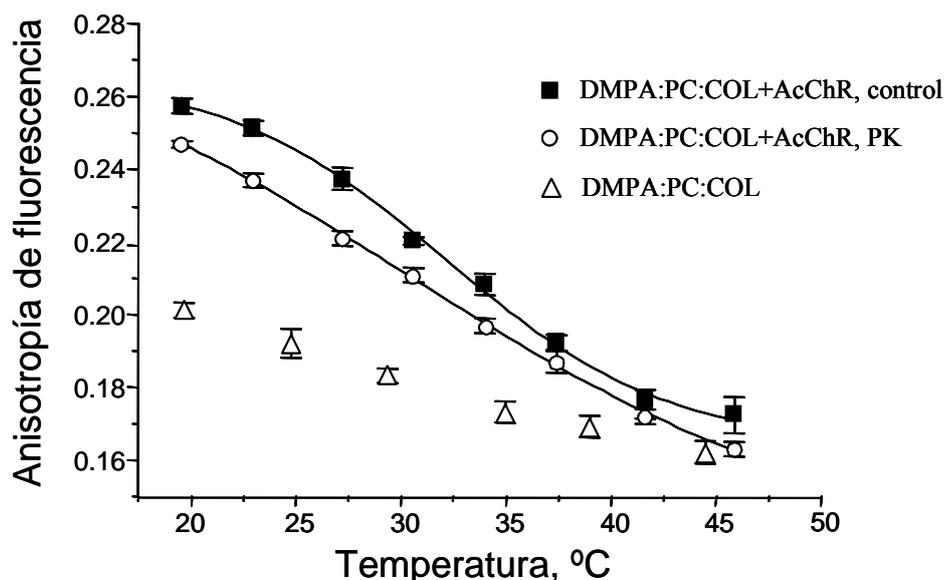


Figura 27. Anisotropía de fluorescencia del AcChR proteolizado. La anisotropía de la sonda *t*-PnA en muestras de DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) se sigue con la temperatura. Estas muestras contienen el AcChR en relación molar fosfolípido/proteína 564, íntegro (Control) o proteolizado con proteinasa K (PK), tal y como se detalla en *Materiales y Métodos*, o no contienen AcChR. La muestra control pasó por todos los procesos a los que se somete la muestra proteolizada pero sin la proteinasa K. Los ajustes de los datos experimentales a curvas sigmoideas se muestran como trazas continuas en las muestras con AcChR. La concentración final de DMPA en todas las muestras es 0.12 mM. Los datos se presentan \pm s.e.

En este proceso (ver *Materiales y Métodos*), se solubiliza con detergente muestras de AcChR reconstituidas previamente. De nuevo se someten a una diálisis como en la primera reconstitución, pero en las condiciones que interese probar. En este caso fueron un pH básico y alta fuerza iónica en muestras de AcChR en DMPA:PC:Col (relación molar 25:50:25) a una relación molar fosfolípido-proteína de 564.

En la **figura 28** se muestran estos resultados, en los que se puede ver que la propia rereconstitución es un proceso que afecta al dominio aunque no se modifiquen las condiciones en que se hace la diálisis normalmente. Por ello, la interpretación de los resultados resulta difícil, aunque, si comparamos estos datos con los obtenidos en ausencia del AcChR donde no hay dominio, parece que un aumento de pH hasta 10 imposibilita la formación del mismo, no siendo así una fuerza iónica alta (NaCl 2M) a pH 7.4.

Ya que el proceso de rereconstitución no dio resultados aclaradores, se realizaron reconstituciones del AcChR en diferentes condiciones para ver cómo afectaban las mismas a la formación del dominio. Se probó un pH 10 y fuerza iónica alta (2 M de NaCl) obteniéndose los resultados que quedan reflejados en la **figura 29**. Estas condiciones extremas de pH y fuerza iónica imposibilitan la formación del dominio que sí se produce en el experimento control (NaCl 100 mM, pH 7.4).

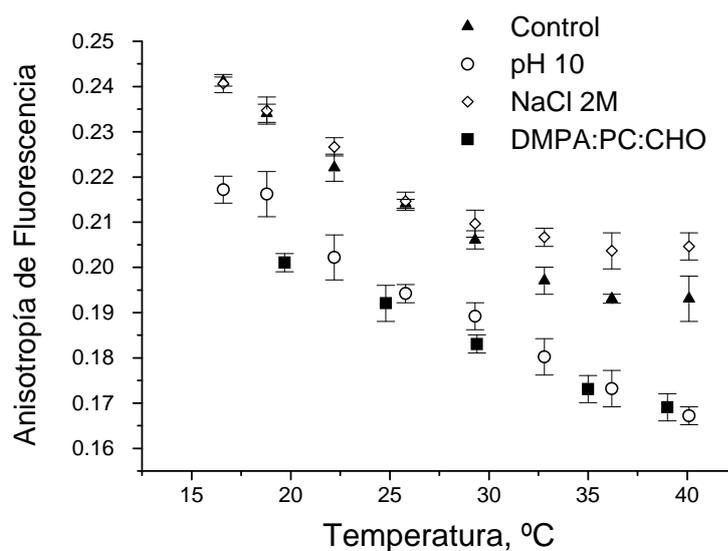


Figura 28. Anisotropía de fluorescencia de muestras rereconstituidas. Muestras compuestas por DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) con AcChR, relación molar fosfolípido proteína 564, se sometieron a experimentos de anisotropía de fluorescencia añadiéndoles la sonda *t*-PnA. Estas muestras provienen de una rereconstitución en las que la diálisis de la segunda reconstitución se hace en tampón Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4 (**control**), en tampón Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 10 (**pH 10**) o en tampón Tris 10 mM, NaCl 2M, pH 7.4 (**NaCl 2M**). También se muestran los datos obtenidos para una muestra de este tipo de vesículas sin AcChR (**DMPA:PC:Col**). Concentración final DMPA 0.12 mM en todas las muestras. Los datos se presentan \pm s.e.

También se puede apreciar en esta figura que el valor de anisotropía a pH 10 o NaCl 2 M es muy alto a cualquier temperatura, pero el mismo resultado se obtiene en las muestras sin AcChR (datos no mostrados). Una posibilidad para explicar estos valores de anisotropía sería que estas condiciones extremas afectaran directamente a la propia sonda y que imposibilitaran la detección del dominio. Sin embargo, en muestras rereconstituidas en condiciones normales y a las que se les cambia el pH a 10 o la fuerza iónica de 2 M en el momento de realizar el experimento, la sonda sí es capaz de detectar el dominio (**figura 22**).

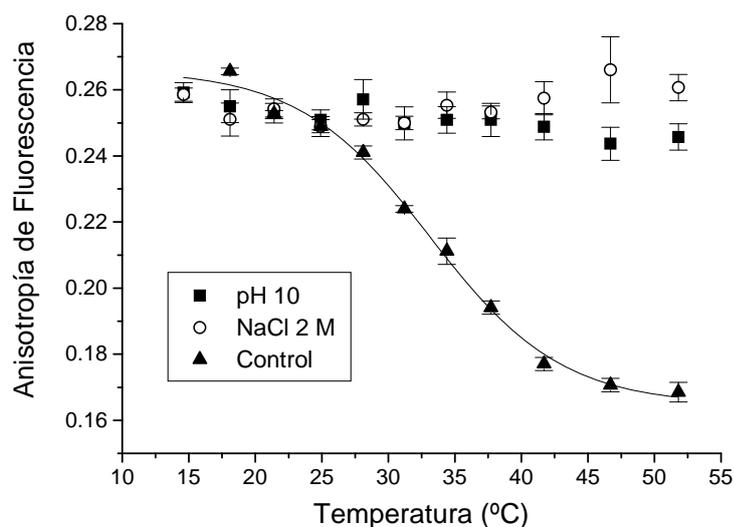


Figura 29. Anisotropía de fluorescencia de muestras reconstituidas en diferentes condiciones. El AcChR purificado se reconstituyó en DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) a una relación molar fosfolípido/proteína 564 en las mismas condiciones experimentales que en todos los experimentos anteriores. Sin embargo las muestras se dializaron frente a Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4 (**Control**), Tris 10 mM, NaCl 2 M, pH 7.4 (**NaCl 2M**) o Tris 10 mM, NaCl 2 M, pH 10 (**pH 10**). Para realizar los experimentos, las muestras se diluyeron en el mismo tampón en el que se dializaron. Los datos se presentan \pm s.e.

7.- La estructura y función del AcChR dependen de la composición lipídica de la membrana en que se reconstituye la proteína

7.1.- Actividad del AcChR reconstituido en diferentes matrices lipídicas

Trabajos anteriores han demostrado que la función del AcChR es sensible al entorno lipídico en el que se encuentra (ver *Introducción*). Así, parecen imprescindibles para mantener la función de la proteína la presencia de ácido fosfatídico y del colesterol. Puesto que esta proteína aparentemente sólo es capaz de segregar PA de una matriz lipídica compleja, es interesante comprobar si la presencia de éste y otros fosfolípidos alteran la funcionalidad del AcChR. Para ello, se llevan a cabo experimentos de “stopped-flow”, técnica ampliamente utilizada para estudiar la función de este receptor (ver *Apéndice*; González-Ros, 1984; Udgaonkar y Hess, 1986.), en muestras de AcChR reconstituido a una relación molar fosfolípido-proteína 3500 y con una composición lipídica de PC de huevo (50% molar), colesterol (25% molar) y el 25% molar restante, del fosfolípido a probar. También se hacen vesículas con asolectina, que se tomarán como referencia de máxima actividad del canal (Epstein y Racker, 1978; Ochoa, et al,

1983; Jones et al., 1988; Fong y McNamee, 1986). En la **figura 30** se muestran las trazas de stopped-flow de las distintas vesículas.

Aquellas compuestas sólo por PC de huevo y colesterol no tienen ninguna actividad. Por el contrario, la presencia de un fosfolípido distinto al PC restablece la actividad del canal en mayor o menor medida según el fosfolípido usado. Así, la máxima respuesta a los agonistas colinérgicos se obtiene para las muestras que contienen PA (cerca de la mitad de la máxima respuesta en muestras con asolectina), seguidas por aquellas que contienen PG, el otro fosfolípido aniónico utilizado en el estudio. Finalmente, las muestras con PE exhiben un nivel de actividad muy bajo, que imposibilita determinar los parámetros cinéticos. Es importante reseñar que todos los fosfolípidos usados en estos experimentos tienen la misma composición en cuanto a ácidos grasos, es decir, la del PC de huevo (ver catálogo de Avanti Polar Lipids), por lo que estas muestras no están sujetas a la variabilidad potencial derivada del uso de lípidos con diferentes longitudes o grado de insaturación en sus cadenas acílicas (Criado et al. 1984). Por lo tanto, los resultados anteriores han de ser atribuidos a efectos de las cabezas polares de los diferentes fosfolípidos sobre la función del AcChR.

Los parámetros cinéticos derivados de estos experimentos se obtienen como se especifica en el apartado 6, “*Obtención de parámetros cinéticos de la actividad del AcChR*” en el *Apéndice* y quedan resumidos en la **tabla 3**

Tabla 3. Parámetros cinéticos derivados de los experimentos de stopped-flow con vesículas de AcChR reconstituido en diferentes matrices lipídicas.

Matriz Lipídica	$K_{app}^{max} (s^{-1})$	$K_D (M \cdot 10^{-4})$
Asolectina	87±5.0	2.35±0.05
PC huevo (50%)+Col (25%) +		
+PA(25%)	43±2.2	2.27±0.18
+PG(25%)	10±1.0	1.02±0.03
+PE(25%)	Actividad muy baja	
+PC(25%)	Sin Actividad	

Para todos los ajustes se utilizó una constante de Stern-Volmer (K) de $77 M^{-1}$, obtenida tal y como se detalla en “*Obtención de parámetros cinéticos de la actividad del AcChR*” del *Apéndice*. Los datos se presentan \pm s.d. con $n \geq 3$

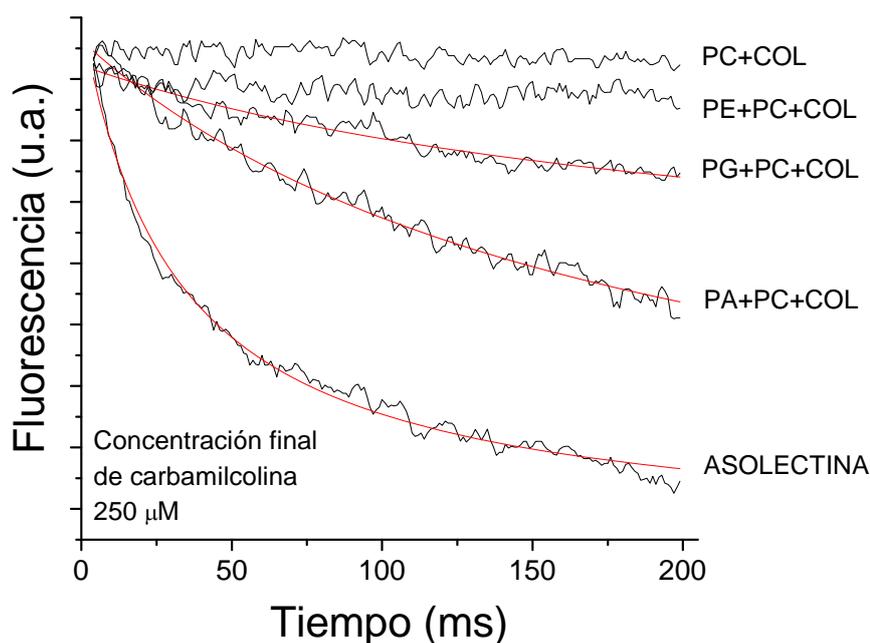


Figura 30. Registros de stopped-flow del AcChR reconstituido en vesículas lipídicas de diferente composición. La entrada de Tl^+ en respuesta a $250 \mu M$ de carbamilcolina (concentración final) se midió en membranas con AcChR reconstituido preparadas a partir de lípidos de asolectina (ASOLECTINA), mezclas lipídicas que contienen 25% molar de colesterol, 50% molar de PC de huevo y 25% molar de: PA de huevo (PA), o PG de huevo (PG), o PE de huevo (PE), o PC de huevo (PC). Superpuestas a estos registros están las curvas de los ajustes a las ecuaciones descritas en “Obtención de parámetros cinéticos de la actividad del AcChR” del Apéndice, a partir de las cuales se hallan los parámetros cinéticos de la actividad del AcChR. Las vesículas se encuentran en tampón Hepes 10 mM, $NaNO_3$ 100 mM, pH 7.4.

7.2- Estructura secundaria del AcChR reconstituido en diferentes matrices lipídicas

Con el fin de tratar de correlacionar los cambios funcionales inducidos en el AcChR por la matriz lipídica en la que se reconstituye con posibles cambios en su estructura secundaria se llevaron a cabo estudios de FTIR. Se analizó fundamentalmente la banda amida I ($1700-1600 \text{ cm}^{-1}$) que es sensible a cambios conformacionales en péptidos y proteínas (Arrondo et al., 1993, Fernández-Ballester et al., 1994; Baenziger et al., 1997). Las matrices usadas en este estudio son las mismas que las de los ensayos de stopped-flow, es decir, PA de huevo: PC de huevo: Col; PG de huevo: PC de huevo: Col; PE de huevo: PC de huevo: Col, todos ellos con una relación molar en sus componentes de 25:50:25; PC de huevo:Col (relación molar 75:25) y lípidos de asolectina que al igual que en los estudios funcionales servirán como matriz de

referencia ya que en ella el AcChR alcanza una actividad óptima. En todas las muestras la relación molar fosfolípido-proteína es 3500.

En la **figura 31A** se compara la amida I de la proteína reconstituida en asolectina con el resto de las matrices lipídicas, observándose un ensanchamiento de banda y otras pequeñas variaciones en estas últimas. Esos cambios espectrales son: i) menos pronunciados en las muestras que contienen PA, ii) más apreciables en muestras reconstituidas en mezclas de PC de huevo y colesterol, iii) de una magnitud intermedia cuando se trata de mezclas que contienen PE y PG. Se encuentran cambios parecidos si lo que se compara es el espectro de amida I deconvuelto (**figura 31B**) en el que debido al proceso matemático a que se somete el espectro, hay un estrechamiento de bandas que permiten observar mejor estas variaciones. De nuevo, la presencia de PA en las vesículas reconstituidas determina el que haya una mínima alteración en el espectro deconvuelto de la proteína, el cual de hecho es muy parecido al de la proteína en asolectina. Por otro lado, la matriz lipídica que perturba en mayor medida la función del canal, es decir aquella con PC como único fosfolípido, presenta un espectro claramente distorsionado en el que i) la relación entre la absorbancia a 1656 cm^{-1} y 1636 cm^{-1} , atribuidas a estructuras en alfa hélice y hoja beta respectivamente, parece menor, ii) el hombro a $1640\text{-}1644\text{ cm}^{-1}$, asignado a estructuras no ordenadas, así como otros componentes que aparecen en la región $1670\text{-}1690\text{ cm}^{-1}$, asignada mayoritariamente a estructura en giros, se hace mayor. También, como se puede anticipar de los espectros originales, los espectros deconvueltos de las muestras con PE y PG muestran alteraciones que de alguna manera son intermediarias entre aquellas descritas para PA y PC.

Además de la información cualitativa comentada anteriormente, la espectroscopia infrarroja puede ser usada para determinar cuantitativamente la estructura secundaria de las proteínas (ver apartado 1.7, "*Procesamiento de datos y técnicas de aumento de resolución*" del Apéndice). La **figura 32 (A y B)** es un ejemplo con resultados de descomposición de banda amida I obtenida en dos de las muestras estudiadas, una funcional según los datos de "stopped-flow", como es la que contiene PA de huevo y otra no funcional compuesta por PC de huevo y colesterol.

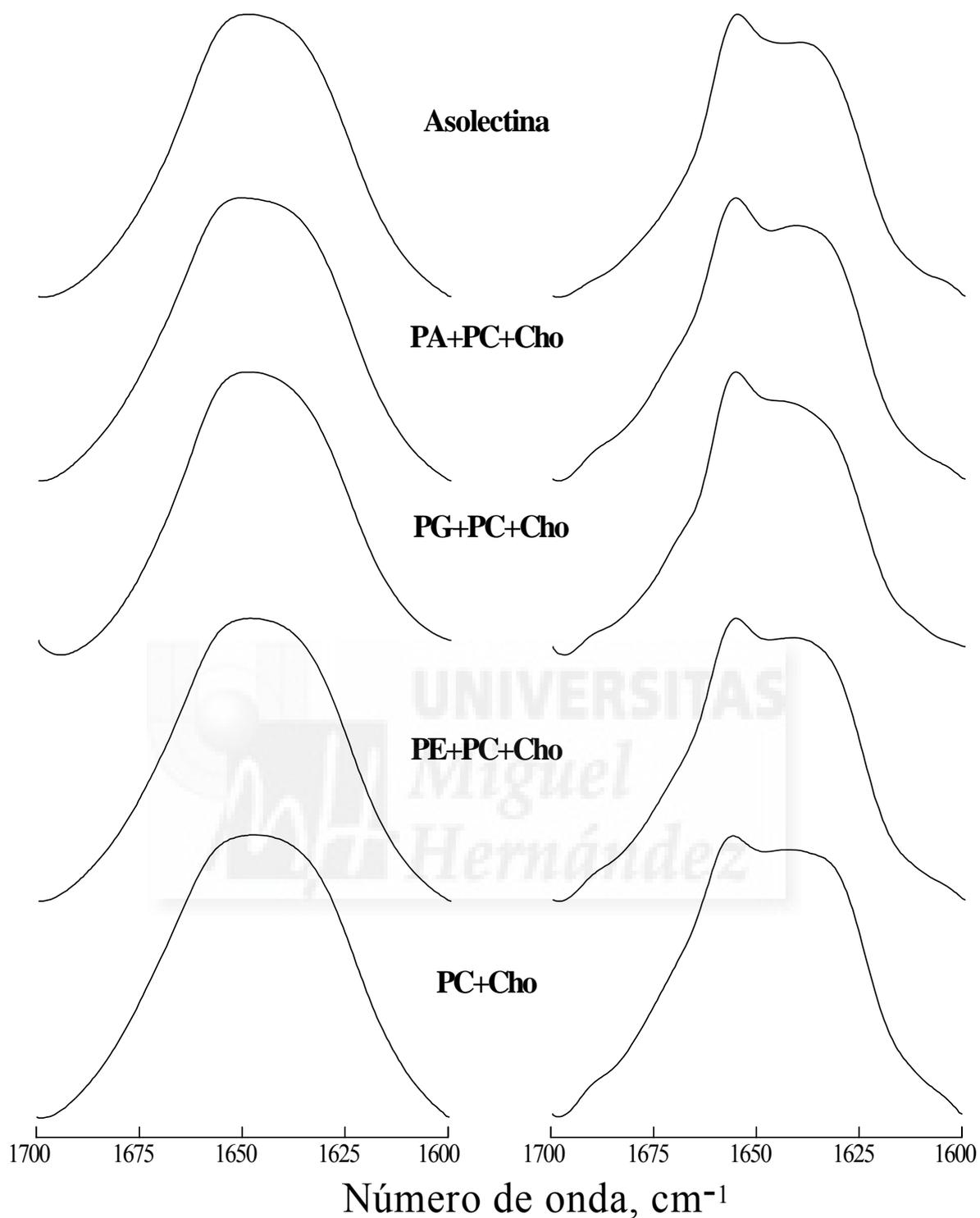


Figura 31. Banda de amida I del espectro de infrarrojo del AcChR reconstituido en distintas matrices lipídicas. En el **panel A**, se muestra el espectro original y en el **panel B**, el deconvuelto. Entre ambos espectros se indica la composición de la matriz lipídica. La relación molar fosfolípido/proteína en todas ellas es 3500. El tampón usado fue Hepes 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4. Las muestras fueron sometidas a un intercambio de H_2O por D_2O de 3 horas antes de analizarse.

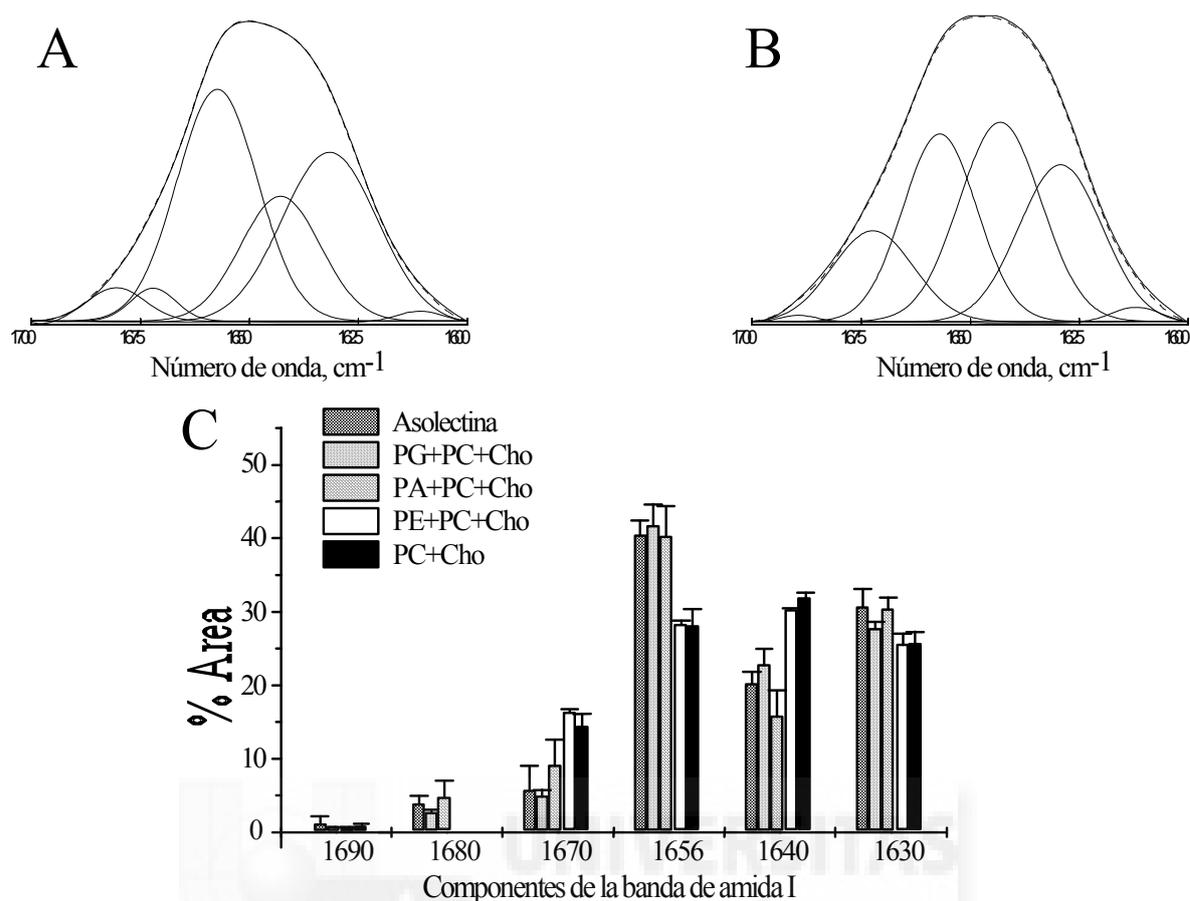


Figura 32. Análisis de ajuste de banda de la amida I del AcChR reconstituido en diferentes matrices lipídicas. Las muestras están compuestas por un 25% molar de colesterol, 50% molar de PC de huevo y 25% molar de PA (**panel A**) o PC (**panel B**). La traza discontinua superpuesta al espectro original es la curva teórica resultante de la contribución de todos los componentes individuales estimados en el ajuste. El **panel C** muestra los porcentajes calculados (\pm s.d.) de los componentes de la banda amida I asignados a diferentes motivos estructurales en muestras de AcChR reconstituido en diferentes vesículas lipídicas y tratadas en las mismas condiciones que se detallan en la figura 31. (n=3).

La **figura 32C** muestra los estimados de estructura secundaria en todas las muestras procesadas. Atendiendo a los cambios en las estructuras mayoritarias, como son hélice alfa (1656 cm^{-1}), hoja beta (1630 cm^{-1}) y no ordenada (1640 cm^{-1}) que se pueden observar entre las matrices funcionales (asolectina, PA+PC+Col, PG+PC+Col) y no funcionales (PC+Col o PE+PC+Col), se puede decir que las últimas tienen una mayor proporción de estructura no ordenada a expensas de una menor proporción de estructura en alfa hélice. Aún teniendo en cuenta el error experimental que inevitablemente acompaña a estas determinaciones de estructura secundaria, las diferencias son de un 10%. Por el contrario, el componente de estructura beta, a 1630 cm^{-1} parece que no está demasiado afectado por el lípido en que se reconstituya el

AcChR. Otros cambios en componentes menores de la amida I, son la desaparición de la banda a 1680 cm^{-1} y el incremento de la banda a 1670 cm^{-1} en las muestras no funcionales, atribuibles a giros.

7.3- Análisis de la estabilidad térmica del receptor nicotínico de acetilcolina reconstituido en diferentes matrices lipídicas mediante "espectroscopia diferencial de barrido": consecuencias estructurales

La banda amida II del espectro de infrarrojo de proteínas y péptidos ($1596\text{-}1525\text{ cm}^{-1}$) resulta de vibraciones del grupo N-H, y disminuye su absorbancia como consecuencia del intercambio a N-D. El estudio del AcChR por FT-IR, como se ha comentado en el punto anterior, se realiza con el análisis de los cambios en su estructura secundaria siguiendo la banda amida I ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) y ello supone tener que sustituir el H_2O por D_2O para desplazar la absorbancia del disolvente a una zona del espectro que no interfiera (Mendelsohn y Mantsch, 1986; ver apartado 1.2, "Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier" en Apéndice). El seguimiento de la cinética de intercambio de N-H por N-D, proceso que se inicia con el cambio de disolvente, mediante el análisis de la banda amida II, dependerá de la accesibilidad de los diferentes aminoácidos al mismo y por tanto aportará información sobre la evolución de la estructura terciaria de la proteína.

De acuerdo con trabajos de Baenziger (Baenziger et al., 1999), se puede asumir que la cinética de intercambio H-D llega a un valor estable a partir de las tres horas desde el momento en que el tampón en D_2O entra en contacto con los proteoliposomas en que se encuentra el AcChR. Así pues, en todos los experimentos de FT-IR se ha esperado por defecto un mínimo de ese tiempo para conseguir el máximo de intercambio, comprobándose que efectivamente en todas las muestras tratadas, pasado ese tiempo, ya no se producen cambios apreciables en la banda de amida I ni en la amida II. A partir de este momento, se adquiere una serie de espectros a la par que se incrementa la temperatura a velocidad constante [$5^\circ\text{C}/13\text{ min}$], lo que por analogía a la calorimetría diferencial de barrido podría permitirnos hablar de *espectroscopia diferencial de barrido*. Este tipo de experimentos permite observar el desplegamiento de la estructura terciaria de la proteína conforme se va desnaturalizando por efecto de la temperatura.

El análisis que a continuación se hace supone el seguimiento de la absorbancia máxima a 1550 cm^{-1} (banda amida II) frente al incremento de la temperatura. Los máximos se definen en función de una línea de base

establecida entre 1596-1525 cm^{-1} , y se hacen relativos a la absorbancia máxima de la banda amida I, tomando una línea de base para esta banda entre 1700-1600 cm^{-1} . En la siguiente figura (**figura 33**) podemos observar como la variación de este valor con la temperatura se ajusta a una ecuación de Boltzmann, que puede darnos como parámetro interesante la T_m del proceso de desnaturalización. Además, este análisis da la posibilidad de estimar una "entalpia" del proceso, integrando la función resultante entre los límites de temperatura en que se lleva a cabo el experimento.

Una vez se hace este tipo de experimentos con las mismas matrices con las que se ha realizado los estudios de estructura secundaria y función del AcChR, se puede deducir, tras la obtención de los valores de T_m (**figura 34**), que la matriz en la que el AcChR resulta más estable es PA+PC+Col (25:50:25, razón molar, fosfolípido/proteína 3500:1), seguida de asolectina y PG+PC+Col (25:50:25, razón molar, fosfolípido/proteína 3500:1), es decir, las *matrices funcionales*, en las que se mantiene la actividad de canal iónico del receptor. Significativamente inferiores son las T_m correspondientes de las matrices PE+PC+Col (25:50:25, razón molar, fosfolípido/proteína 3500:1) y PC+PC+Col (75:25, razón molar, fosfolípido/proteína 3500:1), es decir, las *matrices no funcionales*.

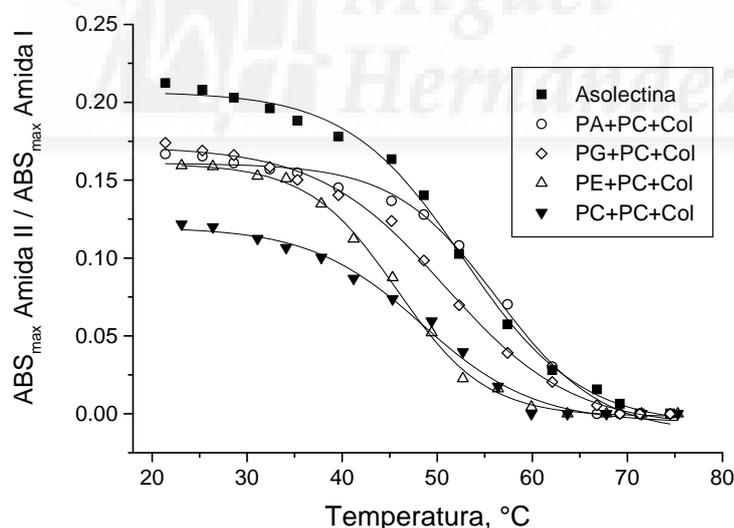


Figura 33. Estabilidad térmica del AcChR seguida por el intercambio H-D. Tras 3 horas de intercambio de H-D, las muestras se someten a una rampa de calentamiento a velocidad constante (5 $^{\circ}\text{C}/13$ min.) mientras se toman espectros de las mismas. De dichos espectros se calcula la absorbancia máxima de la amida II normalizada con el valor de la absorbancia máxima de la amida I. Los ajustes a la ecuación de Boltzmann se presentan como líneas continuas. El tampón usado fue Hepes 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4. $n=2$. s.d. inferior al tamaño de los símbolos.

No obstante, las diferencias en este parámetro son menos claras que si consideramos la "*entalpia*" calculada como la integral de las ecuaciones de ajuste de los datos presentados en la **figura 33**. Estas diferencias validan los análisis de cuantificación de estructura secundaria llevados a cabo sobre la banda amida I (**figura 32**), sujetos a una cierta subjetividad. Por tanto, la matriz lipídica ejerce un efecto modulador de la función del canal a través de la estabilización/desestabilización de la proteína. Otra información que se deduce de estos experimentos es que inicialmente, antes del calentamiento, las diferentes muestras parten de situaciones distintas. Así, el AcChR en asolectina ha intercambiado pocos grupos N-H por N-D en comparación con el resto de matrices. Por el contrario, el AcChR en PC de huevo y colesterol presenta un intercambio mayor al de las demás matrices (**figura 33**), indicativo de una mayor accesibilidad al solvente, es decir, una estructura menos compacta.

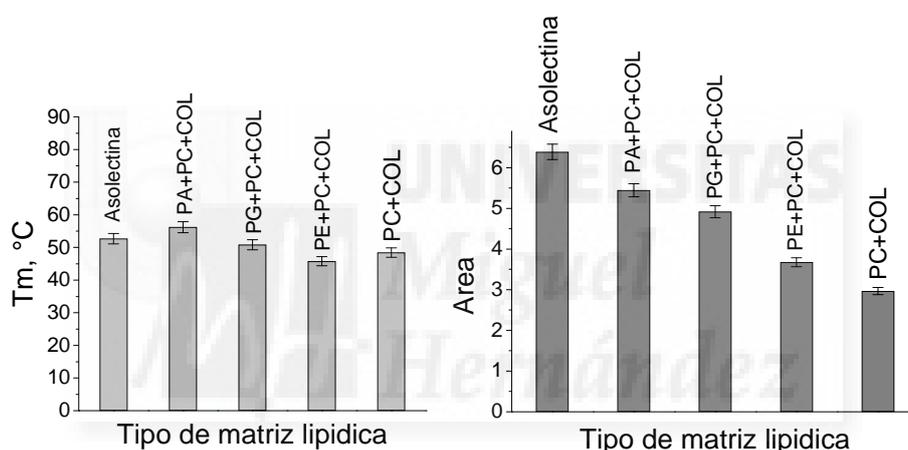


Figura 34. Variación de la Tm y área de las curvas de intercambio H-D. A partir de los ajustes a una ecuación de Boltzmann de los datos de intercambio H-D de la figura 33, se obtienen las áreas de las curvas y las Tm de las mismas, para el AcChR reconstituido en diferentes matrices lipídicas.

8.- El dominio lipídico como potencial diana farmacológica

El dominio de ácido fosfatídico (PA) que segrega el AcChR podría ser importante para preservar la estructura y función óptimas de la proteína según se deducen de los resultados anteriormente comentados en esta memoria. Por otro lado, hay una gran cantidad de sustancias que afectan a la función de la proteína posiblemente a través de la interfase lípido-proteína (Blanton et al., 1999; Bouzat y Barrantes, 1996; Arias, 1998), y por ello, se ha explorado la posibilidad de que dicho efecto se ejerza mediante la eliminación del dominio, en el sentido de imposibilitar la interacción PA-

proteína que parece imprescindible para mantener la función del AcChR. Para evaluar esta posibilidad, se han realizado experimentos de anisotropía de fluorescencia con la sonda *t*-PnA en vesículas que presentan dominio lipídico, es decir, DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) con AcChR a una relación molar fosfolípido-proteína 564, óptima para este tipo de estudios según los resultados presentados a lo largo de esta memoria. Las muestras, antes de la adición de la sonda, fueron incubadas con diferentes sustancias para las que se ha comprobado algún efecto sobre la proteína a través de la interfase lípido-proteína: ácido oleico, ácido araquidónico e hidrocortisona. También se realizó un control con metanol, solvente en el que se encuentran tanto los ácidos oleico y araquidónico como la hidrocortisona, con la misma cantidad que la añadida en las muestras con estos compuestos. Se obtiene una curva superponible a la muestra sólo con lípido y proteína (dato no mostrado), por lo que los posibles efectos en las muestras con ácidos grasos habrán de ser debidos solamente a la acción directa de los mismos.

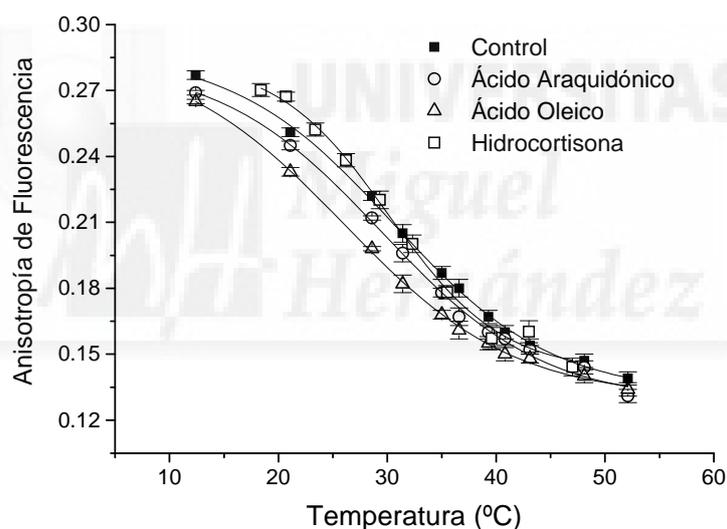


Figura 35. Anisotropía de fluorescencia en presencia de sustancias con efectos sobre la función del AcChR. A muestras compuestas de DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) con AcChR, relación molar fosfolípido/proteína 564, se les añadieron diferentes sustancias disueltas en MeOH: ácido oleico 60 μ M final, ácido araquidónico 60 μ M final e hidrocortisona 800 μ M final, todas ellas con probados efectos sobre la función del AcChR, posiblemente a través de la interfase lípido/proteína. Se siguió la anisotropía de fluorescencia del *t*-PnA añadido a todas ellas con la temperatura. Los ajustes de los datos a curvas sigmoidales se muestran como trazos continuos. La concentración de DMPA final en todas las muestras es 0.12 mM. El tampón utilizado fue Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4. Los datos se presentan \pm s.e.

Por lo que se deduce de los resultados obtenidos (**figura 35**), ninguno de estos compuestos elimina la segregación del dominio a las concentraciones que, según la literatura, provocan una disfunción en el AcChR, aunque el ácido oleico lo altera levemente, produciendo una disminución de unos ~ 4.5 °C en la temperatura de transición del mismo.

Los anestésicos locales y generales son sustancias de probado efecto sobre el AcChR y que también parecen actuar a través de la interfase lípido proteína. Sin embargo, los que se probaron provocaron una pérdida de la fluorescencia del *t*-PnA que imposibilitó la realización de los experimentos de anisotropía de fluorescencia.

9.- Síntesis de la sonda β -DPH HPA

Esta sonda fue sintetizada como alternativa al uso del *t*-PnA, ya que esta última presenta algunos inconvenientes derivados de su poca estabilidad frente a la temperatura, oxígeno y otras moléculas como algunos anestésicos, que dan lugar a una pérdida rápida de su fluorescencia, limitando así los experimentos que se pueden realizar con la misma.

Como control previo al método de síntesis, ésta se realizó con el fosfolípido sintético DMPC en lugar de la sonda fluorescente. Tras el proceso de digestión con fosfolipasa D (ver *Materiales y Métodos*) el producto esperado es el DMPA, la pureza del cual se comprobó mediante experimentos de FT-IR (datos no mostrados). En ellos, se observó la aparición de una banda a 1560 cm^{-1} que no se detecta en el DMPA puro. Además, la temperatura de transición y la cooperatividad de dicho proceso para el producto obtenido eran diferentes al obtenido con el lípido comercial (Avanti). Uno de los posibles motivos de estas alteraciones es la contaminación del producto obtenido con sílica o las sustancias aglutinantes que lleva la sílica para fijarla a las placas de TLC, proceso cromatográfico al que se sometía al producto de la digestión por fosfolipasa D con el fin de separarlo del DMPC que no hubiera reaccionado (ver *Materiales y Métodos*). Según los resultados de TLC, la digestión enzimática supone una conversión casi del 100% del DMPC en DMPA (**figura 36**), por lo que se repitieron los experimentos con el producto de la síntesis pero sin pasar por la TLC.

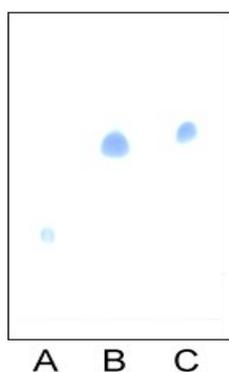


Figura 36. TLC de fosfolípidos sintéticos. La placa de TLC es de Sílica-Gel 60 (Merck) de 0.2 cm de espesor y la fase móvil está compuesta por cloroformo:etanol:agua:trietilamina (25:35:6:35). Se paró la cromatografía 15 minutos después de que el frente alcance el final de la placa, tras lo que se saca de la cubeta y se deja secar. Para observar los productos, se aplica sobre la placa Phospray (Sigma). En la calle A, se situó la muestra de DMPC comercial; en la B el producto de la digestión con fosfolipasa D y en la C, DMPA comercial.

En este caso, se obtuvieron resultados positivos en cuanto a temperatura de transición, cooperatividad y señales de FTIR, valores todos propios del DMPA puro (datos no mostrados).

Un último y definitivo ensayo fue utilizar esta DMPA de síntesis enzimática en vez de la DMPA comercial en mezclas de DMPA:PC de huevo:Col (25:50:25 relación molar) con AcChR a relación fosfolípido:proteína 564 molar y comprobar si el dominio era detectado mediante experimentos de anisotropía de fluorescencia con *t*-PnA como sonda. Los resultados confirman que sólo el DMPA que no ha pasado por TLC es capaz de ser segregado como un dominio por la proteína (**figura 37**).

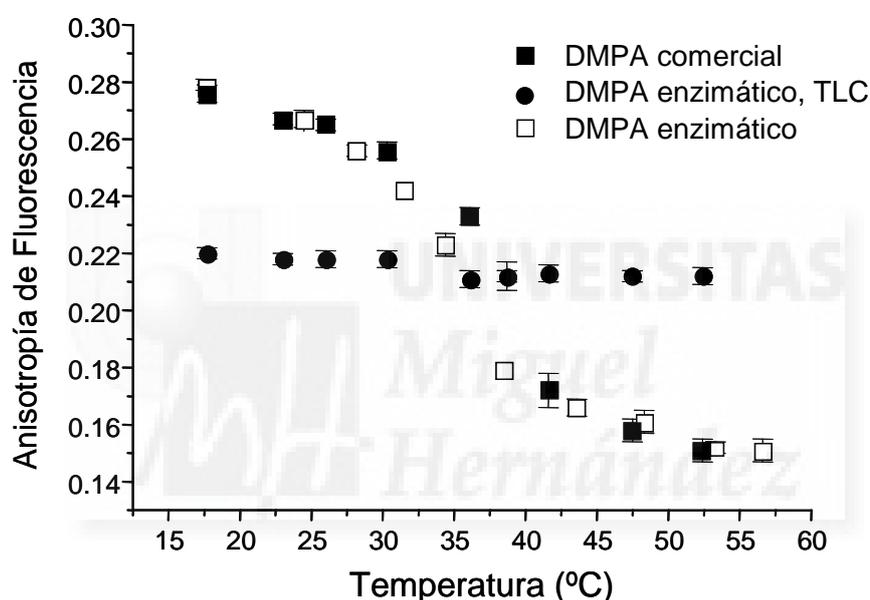
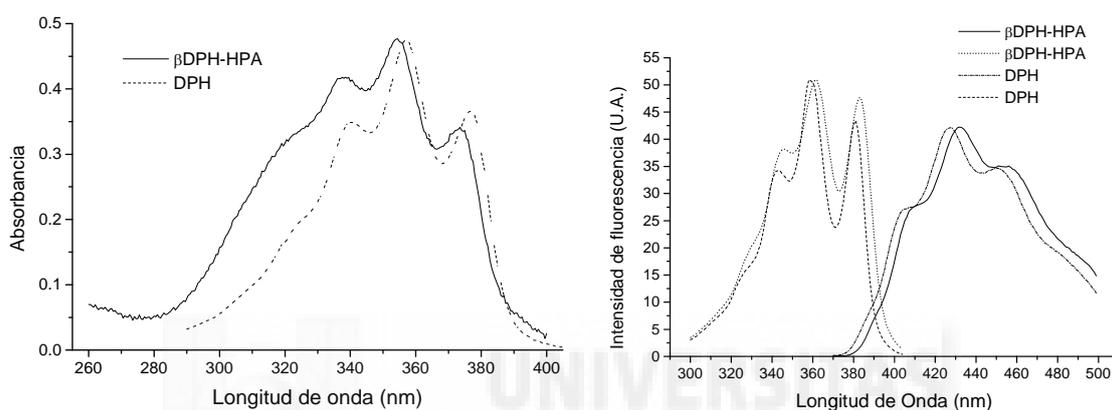


Figura 37. Anisotropía de fluorescencia de muestras con DMPA sintetizado por digestión enzimática. Para la obtención de estos datos se añadió la sonda *t*-PnA a muestras de DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) con AcChR, relación molar fosfolípido/proteína 564 y se siguió su anisotropía con la temperatura. El DMPA de las muestras es de origen comercial (DMPA comercial) o sintetizado por digestión enzimática y separado de los reactivos por TLC (DMPA enzimático, TLC) o sin pasar por TLC (DMPA enzimático). El tampón utilizado fue Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4. Los datos se presentan \pm s.e.

Tras esta primera comprobación se realizó la síntesis con la sonda fluorescente sin someterla a una TLC preparativa, aunque una pequeña alícuota sí se utilizó en una TLC analítica para comprobar que el rendimiento de la digestión era cercano al 100%. A continuación, se realizó una caracterización espectroscópica, realizando espectros de absorción en metanol, de emisión y excitación en lípido y comparándolos con los de la sonda DPH (**figura 38**).

Se puede comprobar que presenta espectros de fluorescencia similares al DPH, molécula que confiere la fluorescencia a esta sonda, aunque tanto el espectro de excitación como el de emisión de la sonda β -DPH HPA aparecen desplazados ligeramente hacia mayores longitudes de onda respecto al del DPH, al igual que sucede con otros derivados del DPH como el PA-DPH o el TMA-DPH (Trotter y Storch, 1989). El máximo de excitación está a 361 nm y el de emisión a 432 nm. En cuanto a los espectros de absorción, también la sonda β -DPH HPA aparece algo desplazada respecto al DPH, aunque esta vez hacia menores longitudes de onda, con un máximo en



torno a los 355 nm. Además, en el espectro de absorción aparece un hombro aproximadamente a 320 nm, que pudiera provenir de una contaminación, y que en cualquier caso no es fluorescente según los espectros de fluorescencia realizados con longitud de onda de excitación a 320 nm (dato no mostrado). Por esta razón la concentración de esta sonda se calculó a partir de la absorbancia a 374 nm, zona con un máximo de absorción para la sonda pero donde la absorción del contaminante se puede despreciar.

Figura 38. Caracterización espectroscópica del β -DPH HPA. Los espectros de absorción del β -DPH HPA y DPH en metanol, se presentan en el **panel A**. En el **panel B**, se muestran los espectros de excitación y emisión de esta sonda y del DPH para su comparación, todos ellos realizados en PC de huevo. Todos los espectros están normalizados para una mejor comparación.

Tras estos primeros controles la sonda β -DPH HPA se incluyó en matrices lipídicas compuestas por un fosfolípido puro, ya sea DMPA o DMPC. Se siguió la anisotropía de fluorescencia con la temperatura obteniéndose curvas sigmoideas similares a la sonda DPH que se usó en este caso como control. La temperatura de transición obtenida tras el ajuste de los puntos experimentales a una curva sigmoideal fue la esperada para este tipo de lípido (datos no mostrados).

Puesto que la sonda había dado resultados positivos en todos estos controles, finalmente, se adicionó a vesículas compuestas por DMPA:PC de huevo: Col (relación

molar 25:50:25) con AcChR a una relación molar fosfolípido/proteína de 564, óptimas para la detección del dominio según los resultados obtenidos con la sonda *t*-PnA. La anisotropía de fluorescencia de la sonda se siguió con la temperatura obteniéndose curvas como la de la **figura 39**. Se observa un cambio muy pequeño y poco cooperativo de la anisotropía de fluorescencia con la temperatura, al igual que ocurría con el DPH y PA-DPH, por lo que no parece una buena sonda para la detección de este tipo de dominios lipídicos. Aún así, el ajuste de los puntos experimentales a una curva sigmoidal resulta en unos valores de temperatura de transición del orden de los obtenidos con el *t*-PnA.

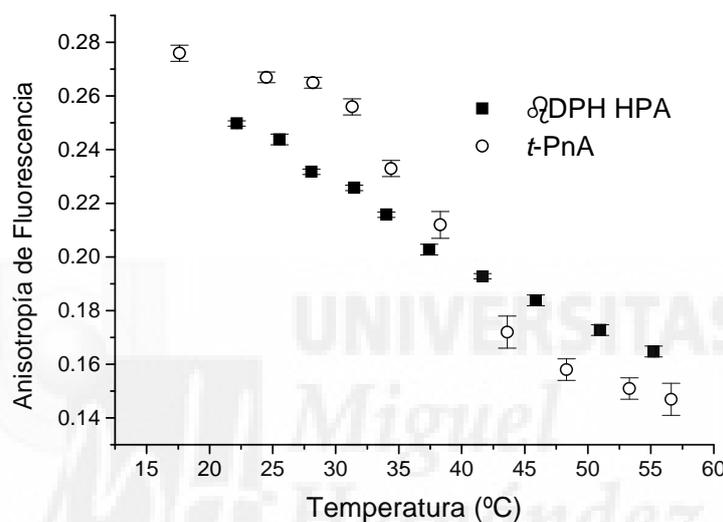


Figura 39. Anisotropía de fluorescencia de la sonda β -DPH HPA. La sonda β -DPH HPA fue añadida de manera intrínseca (ver *Materiales y Métodos*) a una muestra de DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) con AcChR, relación molar fosfolípido/proteína 564. Se siguió la variación de la anisotropía de fluorescencia con la temperatura de esta sonda. Para su comparación también se muestran los datos obtenidos con la sonda *t*-PnA con una muestra hecha en paralelo pero sin la adición intrínseca de β -DPH HPA. El tampón utilizado fue Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4. Los datos se presentan \pm s.e.

Los resultados que se consiguieron fueron similares con distintos porcentajes de sonda (0.1, 1 o 10%, en moles respecto al DMPA) o con la adición de la misma de manera extrínseca o intrínseca (ver *Materiales y Métodos*), por lo que definitivamente se descartó el uso de esta sonda para el estudio de estos dominios lipídicos.

DISCUSIÓN



El receptor de acetilcolina ha sido una proteína de enorme importancia en los últimos años para el conocimiento de la estructura y función de los receptores activados por ligando (LGIC). Hoy en día, pese a que las técnicas de biología molecular han facilitado la obtención en grandes cantidades de casi cualquier proteína, el AcChR sigue siendo el objetivo de numerosas investigaciones. Muchas de ellas están centradas en la estructura del canal o de los sitios de unión, pero uno de los aspectos más interesantes que queda por dilucidar es la dinámica de funcionamiento de la proteína, es decir, cómo interaccionan las distintas partes que lo componen para dar respuesta a la unión del ligando. En este sentido, el estudio de la modulación que cualquier sustancia realice sobre la función de la proteína, a parte de su interés farmacológico, puede aportar datos interesantes en el conocimiento de la dinámica del AcChR y por extensión de todos los componentes de la familia de LGIC. Entre los moduladores de la función de las proteínas, hasta hace pocos años, no se tenía en cuenta a los lípidos, sustancias consideradas únicamente como soportes de las proteínas de membrana en el ámbito de las interacciones lípido-proteína. Sin embargo, se han ido acumulando una gran cantidad de resultados que señalan como fundamentales estas interacciones en la función de cualquier proteína de membrana. En el caso del AcChR ya hay bastantes datos en este sentido aunque aún se dista mucho de alcanzar una comprensión detallada de cómo es esta interacción entre el AcChR y los lípidos que lo rodean. También hay un evidente interés farmacológico en estos aspectos porque hay sustancias de uso clínico, como por ejemplo algunos anestésicos, que parecen interaccionar con el AcChR a través de la interfase lípido-proteína.

Partiendo de la base de que el AcChR interacciona preferentemente con el ácido fosfatídico (PA) y con el colesterol (Col), en esta memoria se ha realizado un estudio dirigido básicamente a evaluar los efectos que esta proteína ejerce sobre los lípidos que lo rodean y viceversa. Para ello se ha recurrido a la reconstitución del AcChR en vesículas lipídicas, sistema en el que la proteína conserva sus propiedades funcionales y en el que se puede variar de forma controlada tanto la composición lipídica como la relación molar entre cada uno de los lípidos y la proteína.

Detección del dominio lipídico segregado por el AcChR

Los primeros estudios se realizaron con vesículas lipídicas en los que sus componentes se mezclan homogéneamente, DMPA, PC de huevo y colesterol. En esta mezcla se incluyó PA y Col por los que la proteína tiene una probada preferencia (Ochoa et al., 1983; Criado et al., 1984; Raines y Krishnan, 1998; Bhushan y McNamee, 1993). Los experimentos realizados por DSC, FT-IR y anisotropía de fluorescencia indican que la presencia del AcChR provoca la reorganización de los

lípidos en las vesículas, dando lugar a la segregación de un dominio lipídico que sufre una transición de fase con una T_m que varía entre los 35 y 43 °C, dependiendo de la técnica con la que se mida. De todos los componentes de estas vesículas, el único que puede tener una transición de fase es el DMPA, por lo que éste ha de ser el lípido que es segregado por el AcChR. Esto queda totalmente confirmado en los experimentos de FT-IR en los que el cambio de fase y por tanto el dominio se detecta a través de las vibraciones del enlace carbono-deuterio (C-D), siendo el único componente lipídico deuterado de la muestra el DMPA.

Cada una de las técnicas utilizadas, aparte de servir de confirmación de los resultados obtenidas con el resto, aporta datos diferentes. Así, los termogramas de la calorimetría permiten hacer un estudio de la termodinámica de la transición de fase: entalpía y entropía de transición, valores de C_p en cada una de las fases, etc. Mediante FT-IR podemos recoger las vibraciones de los distintos grupos químicos que componen el sistema, entre ellos los fosfatos del PA, los grupos carbonilo de los fosfolípidos, la banda de amida I que proviene fundamentalmente de los enlaces peptídicos del AcChR, los metilos y metilenos de los lípidos, etc. En cuanto a la anisotropía de fluorescencia, ésta es sensible al “orden” del medio que rodea a la sonda que se use, siendo el medio en este caso los lípidos que forman las vesículas. Todos estos datos se han obtenido en diferentes condiciones y con su análisis se pretende proponer un modelo para la segregación del dominio lipídico por parte del AcChR.

Estudio del dominio mediante Anisotropía de fluorescencia

De todas estas técnicas, la única que utiliza una sonda extrínseca al sistema es la anisotropía de fluorescencia. En este caso la localización de la sonda es clave para que el dominio sea detectado, ya que la anisotropía de la sonda es sensible sólo a la fase de los lípidos que la rodean. Se probaron sondas con diferentes características, resultando el *t*-PnA la única que detecta el dominio, ya que la variación de su anisotropía de fluorescencia con la temperatura es sigmoideal, indicativo de que existe una transición de fase, en este caso del dominio de DMPA segregado por el AcChR. Este resultado supone que esta sonda ha de estar distribuida preferentemente en ese dominio frente al resto de los lípidos de las vesículas. Las otras sondas probadas no parecen tener una distribución preferente en el dominio pero tampoco parece que queden excluidas del mismo ya que, aunque aparentemente el cambio de su anisotropía con la temperatura no describe una curva sigmoideal, como habría de suceder en un cambio de fase, el ajuste de los datos a ese tipo de curva da como resultado valores de T_m muy similares a los obtenidos con *t*-PnA. Es decir, hay una detección de la transición de fase aunque con menor sensibilidad. Teniendo en cuenta que el DMPA es

sólo el 25% de los lípidos en estas vesículas, es normal que si estas sondas se distribuyen homogéneamente en las mismas, no sean demasiado sensibles al cambio de fase del DMPA en el dominio, que además es de por sí mucho menor que el del fosfolípido puro.

La anisotropía detectada por el *t*-PnA a temperaturas por debajo de la T_m es alta, en torno a 0.25-0.29, lo que significa que este dominio está en una fase ordenada, tipo gel, lo que explicaría la preferencia de esta sonda por este dominio (Sklar, 1979). Este valor de la anisotropía, pese a ser alto, no alcanza a ser el de una fase gel de un fosfolípido puro, que sería aproximadamente de 0.33, dependiendo de la temperatura y del lípido. Esta disminución podría deberse a que el dominio no está constituido sólo de DMPA y/o a que el *t*-PnA, aunque se encuentra localizado mayoritariamente en las fases ordenadas, también se localiza en el resto de la membrana, que se encuentra en fase líquido-cristalino. Por tanto, el valor de $\langle r \rangle$ obtenido es una media ponderada de las anisotropías de estas dos poblaciones. Por encima de la T_m , la anisotropía desciende a 0.16-0.18, valores que corresponden a una fase fluida. Los resultados obtenidos con este tipo de vesículas pero sin AcChR indican que por debajo de 35-40 °C la anisotropía del *t*-PnA es mucho menor a la de la muestra con proteína, es decir, no hay lípidos en fase gel. Por encima de esa temperatura los valores de anisotropía son similares en muestras con o sin proteína, por lo que el estado de fluidez ha de ser similar en el dominio y en el del resto de los lípidos. Además, por encima de la T_m el dominio ya no tiene fase gel por lo que la sonda perderá la preferencia por los lípidos que se encuentren en él.

Los experimentos realizados con la sonda Laurdan no aportan datos demasiado clarificadores en cuanto a la detección del dominio. Por un lado, la variación de exGP con la temperatura no es sigmoidal en muestras con dominio, indicativo de que esta sonda no detecta la presencia del mismo. Posiblemente le ocurre lo mismo que al DPH, PA-DPH o DHE, es decir, que se reparte de una manera homogénea en toda la vesícula o en todo caso queda excluido del dominio de PA. Para esta sonda se ha determinado una distribución homogénea entre fases líquido-cristalino y gel (Parasassi et al., 1990). Por otro lado se realizaron medidas de exGP a diferentes longitudes de onda en matrices con dominio ya que se ha descrito que con este tipo de experimentos se puede determinar si dominios de diferente composición y propiedades de fase coexisten en una misma membrana (Parasassi et al., 1993). En sistemas con sólo una fase líquido-cristalino el valor de exGP disminuye al mover la longitud de onda hacia el rojo, y permanece inalterado en una fase gel. Sin embargo, si coexisten dos fases, hay un incremento en el valor de exGP. Cuando hay un alto porcentaje de colesterol (30% o más), esta tendencia se invierte aunque haya dos fases, teniendo un comportamiento similar al de la fase líquido cristalino, pero con valores absolutos mayores (Parasassi et

al., 1990). En este sentido Castuma et al. (1991) señalan que el enriquecimiento en colesterol de una membrana incrementa la movilidad y disminuye el orden de los lípidos asociados a una proteína de membrana, mientras que disminuye la movilidad e incrementa el orden del resto de los lípidos. Se habla entonces de una fase líquido-ordenada, con propiedades intermedias entre la tipo gel y líquido-cristalino.

Para las muestras con dominio que se han utilizado en este estudio, a baja temperatura han de coexistir la fase tipo gel del dominio y la fluida del resto de lípidos. En esas muestras se obtuvo una variación de exGP con la longitud de onda con una ligera tendencia a disminuir, que correspondería con una fase líquido-ordenado o una fase líquido-cristalino. Las características espectroscópicas de esta sonda dependen de los procesos de relajación dipolar de las moléculas de agua en la interfase lípido-agua. De este modo el Laurdan es capaz de distinguir una fase gel de una líquido-cristalino porque en la primera hay una ausencia de agua o un movimiento muy restringido de la misma debido al fuerte empaquetamiento de los lípidos, y en la segunda hay una rápida velocidad de orientación de estas moléculas, del orden de los nanosegundos. El colesterol es capaz de reducir la hidratación de las bicapas (Levine y Wilkins, 1971), con lo que la sonda en fase fluida y en presencia de este lípido tendrá un comportamiento espectroscópico similar al de una fase tipo gel. Este hecho, unido a la menor población de lípidos en fase gel frente a los de líquido-cristalino explicaría la ineficacia de esta sonda para detectar el dominio. Además, los valores absolutos de exGP son menores que los de una fase gel pura a baja temperatura y mayores que los de una fase fluida a alta temperatura, como corresponden a membranas con una fase intermedia entre gel y líquido-cristalino. Si se comparan las muestras con o sin AcChR, se observa que la presencia del receptor solamente resulta en un ligero aumento del valor de exGP, tanto a 20 °C como a 56 °C, lo que podría reflejar el efecto de deshidratación sobre los lípidos de esta proteína, dato que también aporta el estudio de la vibración del grupo carbonilo de los lípidos por FT-IR (ver más adelante en la discusión). También podría relacionarse este efecto del incremento de exGP con la presencia del dominio en fase tipo gel, pero entonces, a alta temperatura, no debería existir diferencia entre las muestras con o sin proteína, ya que en ese caso habría sólo una fase fluida al estar por encima de la transición de fase del dominio.

β -DPH HPA como sonda fluorescente para detectar el dominio

La detección del dominio compuesto mayoritariamente por ácido fosfatídico (PA) segregado por el AcChR mediante anisotropía de fluorescencia del *t*-PnA ha dado resultados satisfactorios. Sin embargo, esta sonda plantea varios inconvenientes, como su sensibilidad al oxígeno y la temperatura, con lo que se degrada muy fácilmente a lo

largo de un experimento (Sklar et al., 1977; Hudson et al., 1986), limitando así el tiempo y las condiciones de uso. Esto imposibilita hacer algunos experimentos que podrían ser interesantes en este sistema, como los que necesitan de la microscopía de fluorescencia. Por otro lado, también se ha podido comprobar que determinados compuestos de los que se querían probar su efecto desestabilizador sobre el dominio, como por ejemplo algunos anestésicos locales, interaccionan de algún modo con la sonda *t*-PnA haciendo que pierda su fluorescencia en pocos minutos. Por estas razones se planteó la posibilidad de usar un derivado fluorescente del mismo ácido fosfatídico (PA) como sonda fluorescente en lugar del *t*-PnA. Las ventajas a priori que se obtendrían son: por un lado se evitarían los inconvenientes antes mencionados del transparinámico en cuanto a su inestabilidad. Por otro, suponiendo que esta sonda se comportara como el PA, obtendríamos datos de la localización y distribución del principal componente del dominio, y no a través de una sonda como el *t*-PnA que no tiene nada que ver con los componentes del mismo. Otra ventaja adicional es que esta sonda no dejaría de ser un fosfolípido con lo que se podrían seguir señales tales como metilos, metilenos y fosfato mediante FT-IR a fin de obtener más información del dominio. Por último, otro de los experimentos que se tenía en mente para el uso de esta sonda sería la visualización del dominio mediante microscopía de fluorescencia, lo cuál es muy difícil con *t*-PnA debido a su sensibilidad a la luz y a la baja longitud de onda para su excitación.

De las distintas moléculas fluorescentes que se pueden añadir a un fosfolípido, se pensó que el DPH pudiera ser el más adecuado, ya que además de ser probadamente efectivo en detectar cambios de fase de lípidos, esta molécula puede actuar de aceptor de la fluorescencia de los triptófanos del AcChR, o de la sonda dehidroergosterol, posibilitando así el realizar experimentos de transferencia de energía para averiguar la localización relativa del AcChR, PA y colesterol. Además, el DPH es una molécula fotoquímicamente muy estable, lo que posibilitaría la realización de experimentos de microscopía de fluorescencia.

Con todo esto en mente se procedió a la síntesis de esta sonda, ya que no la hay disponible comercialmente. Se partió de la sonda comercial β -DPH HPC, procediendo tal y como se detalla en el capítulo de *Materiales y métodos*. La sonda fluorescente resultante β -DPH HPA es un análogo fluorescente del fosfolípido HPA 1,2-dihexanoil-*sn*-glicero-3-fosfato, en la que una de las cadenas hidrocarbonadas ha sido sustituida por una molécula fluorescente, en este caso el DPH (1,3-difenilhexatrieno). Por tanto, la parte polar de la molécula es idéntica a la del DMPA que forma el dominio. Sin embargo, la parte apolar presenta dos variaciones respecto a este fosfolípido: en el DMPA hay dos cadenas hidrocarbonadas de 14 carbonos cada una, mientras que en la sonda hay una cadena de 16 carbonos y una molécula de DPH.

Una vez realizada la síntesis, se establecieron las características espectroscópicas de la sonda sintetizada como son los espectros de absorción, emisión y excitación en metanol y en distintos componentes lipídicos. A su vez, se comprobó su capacidad para detectar transiciones de fase en lípidos puros mediante anisotropía de fluorescencia. Todos estos controles resultaron positivos. Finalmente se incorporó a muestras de DMPA:PC de huevo:Col (25:50:25 relación molar) con AcChR a una relación molar 564 fosfolípido/proteína, para ver si mediante experimentos de anisotropía de fluorescencia esta sonda era capaz de detectar el dominio como lo hacía el *t*-PnA. Los resultados en este sentido fueron negativos, tanto con la adición extrínseca o intrínseca de la sonda como con el uso de distintos porcentajes de sonda, observándose en todos los casos una variación de la anisotropía de fluorescencia con la temperatura que da una curva con una ligera forma sigmoide. Estas curvas son muy parecidas a las obtenidas con otras sondas fluorescentes como son el DPH o PA-DPH. En todos estos casos se observan curvas cuyo ajuste a una sigmoide dan temperaturas de transición similares a los obtenidos con *t*-PnA, pero con una cooperatividad y amplitud tan pequeñas que no las hacen válidas como sondas para la detección del dominio. Estos resultados indican que la sonda no está distribuida preferentemente en el dominio, por lo que posiblemente lo haga de un modo homogéneo en las vesículas lipídicas, como en el caso del DPH o PA-DPH. Este reparto de la sonda provoca que sólo un pequeño porcentaje se encuentre en los dominios, de ahí la leve variación de la anisotropía con la temperatura. Las causas de este comportamiento diferente al PA pueden ser múltiples empezando por la diferente longitud de cadena que tiene esta sonda, 16 carbonos, frente a los 14 que tiene el DMPA del dominio. Asimismo, debido a la dificultad de alinear una molécula rígida como es el DPH unida a un fosfolípido, a las cadenas acílicas de los fosfolípidos en fase gel (Beck et al., 1990), como sería el dominio segregado por el AcChR, es posible que esta sonda quede excluida de esta fase, o al menos no tenga preferencia por la misma. De hecho, la sonda β -DPH-HPC se reparte preferentemente en fases fluidas (Parente y Lentz, 1985), aunque en el caso del β -DPH-HPE, hay una ligera preferencia por la fase gel en mezclas de PC y PE (Beck et al., 1990). Según estos autores, hay una serie de factores que pueden influir en el reparto de este tipo de sondas entre fases gel y líquido-cristalino, como son el tamaño, capacidad de formar puentes de hidrógeno y carga de la cabeza polar de los fosfolípidos en cada una de las fases, por lo que en diferentes sistemas las sondas se pueden comportar de distinta manera, resultando difícil hacer una estimación a priori del reparto de estas sondas en sistemas lipídicos complejos. Otra circunstancia que no se puede obviar es la posible contaminación que aparece en el producto y cuya naturaleza es desconocida. Los resultados obtenidos al examinar paso a paso la reacción, conducen a que podría haber una contaminación con un producto derivado del vial de plástico en el que el reactivo

(β -DPH-HPC) es comercializado, ya que en el espectro de absorción del propio reactivo, aparece ya un hombro a 320 nm. Este producto habría sido disuelto por los solventes orgánicos que se usan para recoger el reactivo del vial. Por todas estas razones, finalmente esta sonda se descartó en el estudio del dominio segregado por el AcChR

Estudio del dominio mediante DSC

Otra de las técnicas utilizadas para detectar y caracterizar el dominio fue la calorimetría diferencial de barrido. El conjunto de datos obtenidos por DSC pone de relieve que la transición de fase de los lípidos en el dominio tiene una T_m y entalpía mucho menor que la del lípido puro, estimada esta última por el área de la endoterma resultante del cambio de fase. Sin embargo, el cálculo exacto de la entalpía se hace complicado ya que en el termograma obtenido en la muestra con dominio es difícil determinar los límites de la transición de fase. De hecho, el perfil de estos termogramas sugieren que en realidad pudiera haber al menos dos procesos endotérmicos solapados. Uno a más baja temperatura, en torno a los 30-40 °C, muy ancho y por tanto poco cooperativo y otro en torno a los 39-43 °C, mucho más estrecho, que es el que se ha tomado en consideración para calcular la T_m del dominio. Este solapamiento se hace muy evidente en las muestras a una relación molar fosfolípido/AcChR de 3500, con y sin colesterol. En las muestras en que la relación molar fosfolípido/AcChR es de 564, aparece incluso un tercer componente también muy ancho en torno a los 20-25 °C, si bien podría tratarse de un desplazamiento a una T_m inferior del componente ancho de la endoterma. De todos estos resultados, podríamos concluir que dentro del dominio segregado por el AcChR habría como mínimo dos poblaciones, una con una temperatura de transición de fase más alta y cooperativa, y otra con una T_m más baja y poco cooperativa. La formación de dos poblaciones ya ha sido descrita en sistemas de fosfolípidos puros a los que se les ha añadido colesterol o una proteína. Se suele distinguir en esos casos entre un dominio pobre y otro rico en la sustancia añadida. En el primero se conserva la cooperatividad y T_m del fosfolípido original, mientras que en el segundo estos parámetros quedan altamente afectados, normalmente con una disminución en el valor de ambos, dando lugar a endotermas muy anchas. En el caso de mezclas de fosfolípido-proteína, se habla de una población de fosfolípido libre que conservaría sus propiedades termodinámicas y otra población de fosfolípido que solvataría a la proteína pero que también tendría una transición de fase aunque muy diferente a la del fosfolípido libre (Heyn et al., 1981; Zhang et al., 1992, 1995). Para muestras de un fosfolípido puro con colesterol, numerosos trabajos distinguen dos fases si el contenido de colesterol es menor al 15-25%, una enriquecida en el mismo con una transición de fase a menor T_m , más ancha y otra a mayor T_m , más estrecha y con

menos contenido de este lípido (Mabrey et al., 1978; Estep et al., 1978; Calhoun y Shipley, 1979; Blume, 1980). Trasladando estos datos al sistema que se ha estudiado en esta memoria, podríamos hablar de un dominio enriquecido en DMPA y subdividido en dos partes, una con la transición de fase muy afectada y otra menos, aunque las dos a menor T_m que el DMPA puro. Parece que la proteína por si misma afecta a ambas poblaciones ya que en ausencia de colesterol, sus transiciones de fase ya son muy diferentes a la del DMPA puro, lo que estaría de acuerdo con trabajos anteriores realizados en membranas de fosfolípidos puros que indican que la transición de fase ocurre a menor temperatura y es más ancha cuanto mayor es el contenido en AcChR (Bhushan y McNamee, 1990). Lo mismo se puede decir del colesterol, cuya presencia disminuye la T_m y el área de las transiciones de fase de los dos dominios.

Con todos estos datos, lo más lógico es pensar que el dominio a menor T_m estaría situado más cerca de la proteína, de ahí esa T_m y esa mayor anchura en la endoterma, mientras que el de mayor T_m estaría más lejos de la proteína y por tanto con una endoterma más propia de un fosfolípido puro. El colesterol, según se desprende de los datos obtenidos, estaría presente en ambos dominios aunque no es posible determinar si en la misma proporción.

Todos estos detalles anteriormente comentados no son apreciables con los experimentos de FT-IR o anisotropía de fluorescencia. Aparentemente, en estas técnicas los dos o más procesos endotérmicos detectados por DSC se solapan de tal manera que sólo aparece una transición de fase con una cierta cooperatividad, estimada por la sigmoidicidad de la curva obtenida. Esto podría explicar el menor valor de las T_m obtenidas con estas técnicas respecto al DSC. No es de extrañar que la calorimetría, donde se miden directamente la energía de los procesos que ocurren durante el calentamiento de una muestra, aporte datos más precisos sobre la transición de fase del dominio segregado por el AcChR, que en el caso del FT-IR o la anisotropía de fluorescencia, donde se detectan transiciones de fase de una manera indirecta, a través de las vibraciones de ciertos grupos químicos o por el impedimento en el movimiento de una sonda, respectivamente.

Mientras que el colesterol parece afectar de igual manera a los dos subdominios de PA, no es así para la desnaturalización del AcChR. Comparando el primer y segundo barrido obtenidos mediante DSC, se observa que en el segundo el AcChR está desnaturalizado, ya que no aparece la endoterma a alta temperatura, en torno a 55 °C, y que mientras el valor de T_m es menor para los dos dominios respecto al primer barrido, la altura del pico a mayor T_m disminuye claramente mientras que parece haber un aumento en la altura del pico de menor T_m . Estos datos sugieren una reorganización lipídica como consecuencia de esta desnaturalización, en el sentido de que pudiera haber un menor número de moléculas en el dominio de alta T_m , a costa de

un mayor número de moléculas en el dominio de baja T_m . Si atendemos al perfil obtenido a una relación molar fosfolípido/AcChR de 564 frente al de 3500, podría haber una reorganización lipídica pero en el sentido contrario, es decir, con un aumento de los lípidos en el dominio de mayor T_m respecto a los que hay en el de baja T_m . Se puede observar que el pico a mayor T_m tiene una altura mucho mayor en relación al de baja T_m cuando hay más proteína. En cualquier caso, hay que tener en cuenta que todas estas apreciaciones son meramente cualitativas, ya que sería muy difícil establecer en los termogramas obtenidos los valores exactos de la altura de cada uno de los picos. Estos dos resultados ponen de relieve dos aspectos: que la integridad de la proteína y la relación lípido/AcChR son importantes en la organización de este dominio. Del primero, suponiendo que la desnaturalización afecta principalmente a los segmentos extramembrana y en menor medida a los transmembrana, lo que estaría justificado en base a la mayor resistencia de estos últimos a la desnaturalización detectada por FT-IR (Méthot y Baenziger, 1998), nos indica que los segmentos extramembrana podrían interactuar con los lípidos que rodean al AcChR con lo que contribuirían a la reorganización lipídica, si bien los segmentos transmembrana son los principales elementos en este proceso, ya que aunque la proteína quede desnaturalizada, la segregación todavía se mantiene. Esto supone que los segmentos transmembrana siguen interactuando con el PA de alguna manera para mantener la segregación de este fosfolípido, lo que sugiere que la estructura de esta parte de la proteína no debe variar sustancialmente tras la desnaturalización. La gran estabilidad de los segmentos transmembrana también se ha observado en experimentos de intercambio H-D en FT-IR (Méthot y Baenziger, 1998). Estos datos se ven apoyados con los obtenidos mediante anisotropía de fluorescencia con el receptor proteolizado parcialmente con proteinasa K, si bien no se llegan a eliminar completamente los segmentos extramembrana. En ese caso se observa una menor cooperatividad de la transición de fase del dominio, reflejada en la poca sigmoideidad de la curva de anisotropía frente a la temperatura aunque el dominio sigue existiendo ya que la anisotropía a baja temperatura es alta. Posiblemente se pierde total o parcialmente el componente de alta temperatura que es el que da mayor cooperatividad al proceso, la misma tendencia que se ve en el segundo barrido por DSC, cuando el AcChR está desnaturalizado. En cualquiera de estos dos experimentos, no hay que descartar que los segmentos transmembrana estén afectados por la desnaturalización o proteólisis y que esa sea la verdadera causa de los cambios en la transición de fase del dominio y no una interacción con residuos de la porción extramembrana. En cuanto a la dependencia del dominio con la relación lípido/AcChR, ya se han descrito efectos similares con la proteína glicoforina (Ruppel et al., 1982). En este caso, se dedujo que el número de los lípidos perturbados depende de la relación lípido-proteína, postulando que a una relación alta de lípido/proteína habría unos 300 lípidos afectados por

molécula de proteína, mientras que a menores relaciones habría sólo unos 100 lípidos afectados. Para el sistema del AcChR no se ha encontrado algo similar en matrices puras de fosfolípido en el rango de 200-800 molar de lípido a proteína (Bhushan y McNamee, 1990). Sin embargo este trabajo se realizó en muestras de DEPC puro, en las que no hay dominio y además no se llegó a una relación molar de 3500 como en el presente trabajo. La proximidad de unas moléculas de AcChR a otras podría alterar el empaquetamiento de los dominios provocando un cambio en la estequiometría del dominio o una reorganización del mismo de forma que algunas moléculas del subdominio a menor T_m pasaran a formar parte del de mayor T_m . No hay que descartar la posible agregación entre diferentes dominios cuando la relación fosfolípido-AcChR es baja, que active ese proceso de reorganización lipídica. Para intentar aclarar estos aspectos se abordó el estudio de la estequiometría del dominio respecto al AcChR, es decir, si la proteína segrega siempre un mismo número de moléculas de DMPA de la mezcla lipídica o no y en caso afirmativo, estimar ese número.

Estequiometría del dominio

Un primer cálculo de la estequiometría del dominio se realizó con los datos de calorimetría diferencial de barrido. El mínimo tamaño del dominio segregado de PA puede ser estimado por el calor involucrado en el evento térmico observado, de acuerdo con la expresión:

$$n_{\text{DMPA}} = Q/\Delta H_{\text{DMPA}} (\text{dominio})$$

donde n_{DMPA} representa el número de moles de DMPA que experimentan la transición de fase observada, Q , el calor del proceso, y ΔH_{DMPA} , la entalpía de transición molar aparente del DMPA en el dominio, estimada a partir del área total de la endoterma obtenida sin diferenciar entre los dos subdominios anteriormente mencionados. Asumiendo la hipótesis menos favorable por la que la entalpía molar de transición del DMPA en el dominio fuera tan alta como la del fosfolípido puro, se obtendría que cada molécula de AcChR induce la segregación de unas 228 moléculas de DMPA para una relación molar fosfolípido/proteína de 3500, excediendo en casi un orden de magnitud la capacidad de la región transmembrana del AcChR para unir fosfolípidos (45 sitios de unión para fosfolípidos por molécula de AcChR, Jones y McNamee, 1988). En cualquier caso no todas las moléculas de DMPA estarían segregadas, puesto que cuando se hizo el experimento con la misma cantidad de lípidos y una mayor cantidad de proteína, relación molar fosfolípido/proteína 564, la transición de fase observada presentó una entalpía mayor, indicativo de una mayor cantidad de DMPA en los dominios segregados por el AcChR. El cálculo hecho con los datos

entálpicos de estos termogramas daría unas 122 moléculas de DMPA segregadas por cada molécula de AcChR.

La estimación de la estequiometría mediante este tipo de medidas calorimétricas presenta una serie de inconvenientes. El cálculo de la entalpía de transición no se puede realizar de una manera muy fiable puesto que establecer la línea base del termograma no es sencillo, ya que hay una variación en C_p en la muestra antes y después de la transición. Además, es seguro que la presencia del colesterol disminuye la entalpía del DMPA en el dominio respecto a la del DMPA puro, añadiendo otro elemento de error al cálculo. Otro factor a tener en cuenta es el pequeño tamaño de las endotermas detectadas, que están relativamente cerca del límite de la sensibilidad del instrumento. Por todas estas razones se decidió abordar la cuestión de la estequiometría del dominio de otra manera completamente distinta, a través de experimentos de anisotropía de fluorescencia con la sonda *t*-PnA y con muestras a diferente relación molar fosfolípido/AcChR, pero manteniendo la cantidad de lípido fija. La amplitud de las curvas de anisotropía dependerá del número de moléculas de la sonda en el dominio (fase tipo gel), cantidad que dependerá a su vez del número de moléculas de lípido que se segreguen en el dominio, respecto a las que no lo hagan. Por tanto, la amplitud de las curvas de anisotropía indicaría la cantidad de lípido total que se han segregado en los dominios. Estos experimentos señalan una segregación máxima a una relación molar DMPA/AcChR de aproximadamente 190. A una relación mayor o menor, el cambio de anisotropía es menor, y por lo tanto hay menos segregación de lípidos. La interpretación más lógica, aunque no la única, de estos resultados es que cada molécula de AcChR es capaz de segregar una cantidad fija de DMPA, en torno a 190 moléculas. Por ello si hay muy poca proteína, habrá poco DMPA segregado y el cambio de anisotropía observado será pequeño, o la entalpía de transición también. En cambio, al aumentar la cantidad de proteína, siempre con una cantidad de lípido fija, la cantidad total de lípido segregado será mayor, observándose una amplitud mayor en las curvas de anisotropía o una entalpía de transición mayor por DSC. Cuando hay mucha proteína y se rebasa la relación DMPA/AcChR de 190, la curva de anisotropía presenta una amplitud pequeña de nuevo. La razón para este fenómeno pudiera ser la saturación de la muestra con AcChR, que provocará el que no haya DMPA suficiente para cada molécula de receptor con la consiguiente perturbación de los dominios. Esta perturbación podría venir dada por la agregación del AcChR para asegurarse un contacto con el PA, o bien por la entrada de otros lípidos, en este caso PC de huevo al dominio. Algo similar se ha detectado para la proteína transmembrana calcio ATPasa (Jaworsky y Mendelsohn, 1985, 1986), para la que a alta relación lípido-proteína se une exclusivamente a SOPC en mezclas de este fosfolípido con DPPC. Sin embargo al disminuir esta relación también el DPPC se une a la proteína.

Es interesante el que obtengamos un número de moléculas de DMPA en el dominio similar en dos aproximaciones tan diferentes como son la anisotropía de fluorescencia y la calorimetría, máxime cuando para esta última los cálculos se hacen muy complicados en este sistema. Evidentemente, en estos experimentos de anisotropía, a diferencia de los de DSC, no podemos distinguir entre los dos subdominios por lo que no se puede estimar la reorganización lipídica dentro del dominio a diferentes relaciones lípido/AcChR. En el caso de obtener una recta en la representación de la amplitud de la curva de anisotropía frente a la relación molar DMPA/AcChR antes del punto de saturación, podría afirmarse que la estequiometría del dominio es fija, independientemente de la relación lípido-proteína. Sin embargo hay pocos puntos y con mucho error como para afirmar inequívocamente si este es el caso. Los datos de entalpía calculada por DSC indicarían que a menor relación lípido/proteína se segrega un menor número de moléculas de DMPA por cada AcChR como ocurre con la glicoforina (Ruppel et al., 1982), pero tampoco estos datos son fiables a nivel cuantitativo.

Es destacable que los cambios entre las curvas de anisotropía de muestras con distinta relación DMPA/AcChR se den, no sólo a baja temperatura, sino también a alta temperatura, cuando se supone que ya no hay dominio. Lo lógico sería que a alta temperatura la anisotropía fuera igual en todas las muestras al estar el dominio en fase fluida como el resto de los lípidos, y que a baja temperatura hubiera una mayor anisotropía a más lípidos segregados. Al margen de la variabilidad experimental de unas muestras a otras, estos datos podrían indicar que hay un efecto “fluidificador” del AcChR. Hay muchos trabajos que asignan este tipo de efecto de las proteínas de membrana sobre los lípidos que las rodean (Dergunov et al., 1997; Jaworsky y Mendelsohn, 1985, 1896), siendo algunos referidos al AcChR (Sunshine y McNamee, 1994; Narayanaswami y McNamee, 1993), si bien también hay otros trabajos que proponen el efecto opuesto (Antollini et al., 1996, Marsh y Barrantes, 1978). Los experimentos que se han realizado con DPH en vesículas de DMPC:PC de huevo:Col que no presentan dominio, señalan que la anisotropía de esta sonda es menor en presencia del AcChR en un rango de temperaturas de 20-50 °C, es decir, la proteína fluidifica la membrana, y que este efecto es mayor conforme la cantidad de proteína aumenta (datos no mostrados). Esto podría explicar porqué cuanto más AcChR hay en las vesículas con dominio, la anisotropía a alta temperatura es menor. Sin embargo, a baja temperatura, este efecto fluidificador es compensado por la segregación de más moléculas de DMPA en el dominio en fase gel que produce un aumento de la anisotropía haciendo que el cambio de ésta con la cantidad de proteína, a baja temperatura, no sea muy grande.

Como conclusión, se propone que cada molécula de AcChR es capaz de segregar aproximadamente 190 moléculas de DMPA, lo que supone unas cuatro capas

de este fosfolípido si el dominio se encontrara alrededor de la proteína, y un área de 67 nm^2 , suponiendo que el dominio es simétrico en las dos hemicapas de la membrana. Por tanto, este dominio no equivaldría al llamado “ánulo lipídico”, consistente en unas 45 moléculas de lípido, ni a los 95 lípidos que, según estudios de DSC, cada molécula de AcChR impide cambiar de fase cuando se reconstituye en un fosfolípido puro (Bhushan y McNamee, 1990). De este último dato se podría deducir que, de las 190 moléculas de DMPA, 95 no cambiarían de fase y el resto sí. Es posible que estas 95 moléculas correspondan a las del subdominio de baja T_m cercano al AcChR y que en realidad no estén completamente impedidas de realizar una transición de fase. El resto, otras 95 moléculas formarían parte del otro subdominio de mayor T_m y más alejado del AcChR. El dominio detectado mediante RET en la rodopsina, otra proteína transmembrana, excedería también las dos capas de lípidos adyacentes a la proteína (Polozova y Litman, 2000), así como el de la glicoforina (Ruppel et al., 1982). El dato referido a las 190 moléculas de DMPA es tan sólo una aproximación a la estequiometría del proceso de segregación de este fosfolípido por el AcChR, asumiendo que todas las moléculas de DMPA y AcChR presentes en las muestras participan en el proceso. Sin embargo los datos obtenidos mediante FRAP comentados más adelante en este mismo capítulo, apuntan a que es posible que no todas las moléculas de AcChR participen en los dominios, ya que se detectan dos poblaciones de proteína: un 27.8% inmovilizada y el resto libre para difundir. Por tanto, la estequiometría pudiera ser mayor si hay parte de la proteína que no forma parte de los dominios, si bien tampoco es seguro la participación de todas las moléculas de DMPA. Aún así, lo que suceda en las muestras utilizadas en FRAP no tiene porqué cumplirse exactamente en las muestras utilizadas en el resto de técnicas, ya que la relación lípido-proteína es muy diferente y el procesado también.

Estudio de la Capacidad Calorífica

Otro detalle que aporta la calorimetría es que en todas las muestras procesadas, el valor de C_p (capacidad calorífica) a cualquier temperatura es mayor en presencia del AcChR, posiblemente debido a las interacciones lípido-proteína que aportan una energía extra, respecto a las de lípido solo. Sin embargo, en las muestras que presentan dominio lipídico esta tendencia es la contraria, es decir, las muestras con AcChR, presentan termogramas con menor C_p . Este parámetro está relacionado directamente con la capacidad calorífica molar aparente (${}^\phi C_p$), de la que se han propuesto teorías para su cálculo (Blume, 1983). En general se distingue entre una contribución a ${}^\phi C_p$ intrínseca de las moléculas que forman el sistema, que incluye vibraciones moleculares y movimientos de rotación o traslación, etc., y una contribución estructural, debida principalmente a la interacción de estas moléculas con el agua. Para las moléculas

anfipáticas como los lípidos, estas interacciones pueden ser hidrofílicas o hidrofóbicas. En este sentido, una mayor hidratación de los grupos apolares da lugar a un aumento en ϕ_{Cp} , mientras que en los grupos polares dicha hidratación tiene una contribución negativa (Blume, 1983). Sin embargo, una evaluación cuantitativa en un sistema tan complejo como una membrana es muy difícil. En el caso de las muestras con AcChR que presentan dominio, debe haber una serie de contribuciones negativas que superan a la contribución positiva, proveniente de la interacción de los lípidos con la proteína, para que se obtengan valores de Cp menores que en las muestras sin AcChR. El origen de las mismas podría ser una menor entrada de agua a la región hidrofóbica de las membranas, es decir, una menor permeabilidad, o bien una mayor hidratación de la parte polar, dejando aparte otras posibles contribuciones. Una mayor hidratación de la parte polar no parece estar de acuerdo con los datos obtenidos con las medidas de exGP del Laurdan como ya se ha discutido anteriormente, o de los datos de FT-IR del carbonilo (ver más adelante en este capítulo). En el caso del PA, puede haber efectos debidos a cambios en la extensión de los enlaces de hidrógeno intermoleculares. Para este fosfolípido se ha encontrado un valor de ϕ_{Cp} mayor para la especie doble cargada. Se ha descrito que el incremento de la carga en el PA altera el empaquetamiento de este fosfolípido, con un aumento en el ángulo de inclinación de sus cadenas (Jähnig et al., 1979). Además, la unión de contraiones puede jugar un papel importante al desplazar agua de hidratación del grupo fosfato al unirse estos iones, dando lugar a un aumento de ϕ_{Cp} (Blume, 1983). En las muestras en las que hay dominio, podría haber un aumento de la especie monoaniónica del fosfato del PA frente a la dianiónica, es decir un aumento del segundo pK_a del grupo fosfato que produjera una disminución de ϕ_{Cp} , o bien un cambio en la extensión de los enlaces por puente de hidrógeno, respecto a la muestra en la que no hay proteína, en la que evidentemente no hay dominio. En cualquier caso en presencia del AcChR, hay una reorganización importante de la membrana que afecta de manera clara a este parámetro, aunque el origen de esta variación es muy difícil de evaluar, debido a la complejidad que de por sí tiene el sistema, con tres tipos de lípido diferente contribuyendo al valor de ϕ_{Cp} y a la gran cantidad de variables que afectan a este parámetro.

Estudio del dominio mediante FT-IR

En cuanto a la espectroscopia de infrarrojo, se puede destacar un aumento a cualquier temperatura de los valores de tensión simétrica CD_2 para el DMPAd en las muestras con AcChR respecto al DMPAd puro. Esto indicaría que el DMPAd en el dominio estaría con un mayor número de confórmeros tipo *gauche*, es decir, más desorden conformacional en el interior de la bicapa, que en estado puro. En cualquier caso, el DMPAd en la mezcla sin proteína y por tanto en ausencia de dominio, ya está en un estado de desorden conformacional mayor al del DMPA puro e igual al del DMPAd en el dominio a baja temperatura. Lo interesante es que al cambiar de fase, el DMPAd del dominio alcanza un mayor desorden conformacional que el DMPA puro en estado fluido. Este tipo de comportamiento ya ha sido descrito para otras proteínas en su interacción con fosfolípidos puros, aumentando el número de confórmeros *gauche* a cualquier temperatura, siendo la explicación más racional la simple penetración de los segmentos transmembrana de la proteína en la bicapa (Nabet et al., 1994). El efecto “fluidificador” que sobre la membrana efectúa el AcChR según los experimentos de anisotropía de fluorescencia, estaría apoyado por estos datos. Sin embargo, para el AcChR en DEPC por encima de la T_m de este fosfolípido no se han encontrado variaciones en la banda de CD_2 a diferentes relaciones lípido/proteína (Bhushan y McNamee, 1990). Tampoco en los experimentos con muestras de DMPCd:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) en los que no hay segregación de dominio alguno, hay un aumento de confórmeros *gauche* cuando hay AcChR. Esto podría deberse a que no hay interacción directa del DMPCd con el AcChR. Sin embargo, para las muestras en las que hay DMPAd en vez del DMPCd, el aumento de confórmeros *gauche* cuando la proteína está presente podría explicarse si la segregación de este fosfolípido conlleva la interacción con la proteína, es decir, una colocación del AcChR y el dominio de DMPAd. Esta posibilidad está apoyada por los datos de transferencia de energía que se discuten más adelante en este mismo capítulo.

Los datos obtenidos con el grupo carbonilo por FT-IR indican que la presencia del AcChR en vesículas de DMPA, PC de huevo y colesterol produciría una ligera disminución en la hidratación de la bicapa respecto a la muestra sin proteína, posiblemente debido a la menor accesibilidad a la superficie de la bicapa para las moléculas de agua. Este efecto podría deberse a la formación del dominio en fase tipo gel (Désormeaux et al., 1992; Blume et al., 1988) cuando la proteína está presente, aunque el que la deshidratación también se detecte por encima de la temperatura de transición del dominio descartaría tal posibilidad. Resultados similares se han obtenido en otros estudios de interacción de proteínas con membranas lipídicas (Sedzik et al., 1984), o bien se han encontrado resultados opuestos según el estado del fosfolípido: hidratación en fase gel y deshidratación en fase líquido-cristalino (Nabet et al., 1994).

Este efecto podría explicarse si existiera una interacción entre los tramos extramembrana del AcChR y la región polar de los fosfolípidos de la membrana que se encuentran a su alrededor. No hay que descartar sin embargo un efecto indirecto, debido a la reorganización lipídica en la membrana inducida por el receptor, que podría afectar al empaquetamiento de los lípidos con el consiguiente efecto sobre la hidratación de los mismos. Así, un dominio de PA como el que se formaría en este caso, al tratarse de un fosfolípido con la cabeza polar pequeña, provocaría una condensación lateral de las cadenas acílicas y un mayor orden en la bicapa (Salmon et al., 1987), lo que a su vez daría lugar a una menor penetración de agua con la deshidratación consiguiente. Los resultados obtenidos con la sonda Laurdan (discutidos anteriormente en este capítulo) apoyarían los datos de FT-IR obtenidos a través de la vibración del carbonilo. Contrariamente a estos resultados, la reconstitución del AcChR en DEPC da lugar a una mayor hidratación de este fosfolípido en presencia de la proteína (Bhushan y McNamee, 1990). Sin embargo, en estas muestras no hay dominios sino un fosfolípido puro por el que la proteína no tiene ninguna preferencia. El grupo polar del DEPC es totalmente diferente al del PA, por lo que las interacciones con la proteína pueden ser muy diferentes, como lo demuestra el hecho de que en este fosfolípido, la presencia del AcChR no altere la vibración del grupo metileno (Bhushan y McNamee, 1990).

Otro grupo que se siguió durante estos experimentos de FT-IR fue el fosfato. Se encontró que la presencia del AcChR en muestras que presentan dominio provoca un aumento de la banda correspondiente al grupo fosfato con una sola carga (monoaniónica) frente a la especie con dos cargas (dianiónica). El único fosfolípido que puede presentar estas dos bandas es el PA, con lo que AcChR estaría provocando un aumento en el valor del pK_a de este fosfolípido. El pK_a de un fosfolípido en la interfase lípido/proteína depende, según la Teoría de Gouy-Chapman, de la polaridad de la región de la interfase lípido-agua, del potencial electrostático de esta región y de la asociación relativa de la proteína con las especies protonadas o desprotonadas del lípido (Sankaram, et al., 1990). A su vez estos parámetros dependen de la temperatura, la constante dieléctrica del agua, la concentración de iones y la densidad superficial de carga (Tocanne y Teissié, 1990). Cualquier elemento que perturbe alguno de estos parámetros, hará que el resto varíen también. El pK_a de un lípido suele aumentar algo más de una unidad por el simple hecho de estar en una bicapa, pero según sea la interacción con la proteína, puede aumentar o disminuir más. La fuerza iónica también da lugar a un aumento de este parámetro. El empaquetamiento de los lípidos determina la disposición de sus grupos polares, lo que condiciona a su vez la densidad superficial de carga y por tanto el pK_a . Es por ello que el pK_a de los fosfolípidos desciende de la fase gel a la líquida-cristalina, aunque esta tendencia puede ser la opuesta según las condiciones del medio. Sankaram y colaboradores obtuvieron un aumento del pK_a de un

ácido graso en una membrana de DMPG en presencia de una proteína que se une a la membrana de manera extrínseca (Sankaram et al., 1990). La explicación más satisfactoria que encontraron fue la de que la proteína produjera una reducción en la hidratación de los grupos polares de los lípidos, disminuyendo la polaridad de la interfase lípido-agua que favorece la especie protonada. Resultados similares se encontraron con la fosfolipasa A2 en membranas con lípidos negativos (Jain y Vaz, 1987), pero todo lo contrario se obtuvo en el estudio de la MBP, proteína básica de la mielina, (Nabet et al., 1994). Los datos obtenidos en los experimentos de FT-IR del grupo carbonilo y los de polarización generalizada de la sonda Laurdan en los que se detectó una ligera deshidratación de los lípidos en presencia del AcChR apoyarían esta hipótesis. Los efectos del AcChR sobre el PA podrían estar mediados por una serie de factores: su simple inclusión en la membrana ocupando un área considerable con el consiguiente efecto sobre el empaquetamiento, que en el caso de producir una condensación de los grupos polares provocaría un aumento de la densidad de carga y por tanto del pK_a ; las interacciones de los residuos de los tramos transmembrana de la proteína, que en caso de estar favorecido respecto a las especie monoaniónica del PA dará lugar a un aumento del pK_a del mismo; las interacciones de los residuos de los tramos extramembrana con los lípidos en las cercanías de la proteína y lo más importante, la propia inducción del dominio con lo que las moléculas de PA estarán mucho más cerca. En este caso, la alta densidad de carga sería desfavorable con lo que un aumento del pK_a facilitaría este proceso. La presencia de colesterol y PC de huevo, que en mayor o menor medida se encuentran en el dominio, han de alterar parámetros como el empaquetamiento del DMPA en el dominio, por lo que también han de influir en el valor final de pK_a y en el efecto que la proteína pueda hacer sobre el mismo.

Los estudios realizados por Bhushan y McNamee (Bhushan y McNamee, 1993) con DOPA concluyen que hay una disminución de los valores de pK_a de unas dos unidades para este fosfolípido en presencia del AcChR. Para estos autores, un aumento de la carga del fosfato favorecería la interacción de este fosfolípido con la proteína. Sin embargo en ese trabajo se utilizó un lípido puro, sin segregación por tanto de PA hacia un dominio, y una relación fosfolípido/proteína muy pequeña que podrían explicar este comportamiento tan diferente. De hecho el efecto del AcChR sobre DMPA puro a baja o alta relación lípido-proteína es la de un descenso acusado de la T_m o un aumento de la T_m respectivamente. También se ha detectado una cierta reorganización del dominio al variar la relación lípido-proteína, que por lo tanto es un factor a tener en cuenta al comparar diferentes estudios.

De la disparidad de datos obtenidos en diferentes sistemas lípido-proteína en cuanto a la hidratación de los carbonilos o el pK_a de los grupos fosfatos, se puede concluir que las interacciones que se ponen en juego en estos sistemas son muy

complejas y que las particularidades del experimento: tipo de proteína, de lípido, de interacción entre ellos y condiciones del experimento, harán que se obtengan unos resultados u otros. En cualquier caso, la mayor parte de los experimentos referidos en otros trabajos se han realizado con lípidos puros en los que la proteína está “forzada” a interactuar sólo con el lípido utilizado, lo que puede dar lugar a resultados distorsionados.

Estudio del dominio mediante FRAP

Una última técnica con la que se estudió la segregación del dominio lipídico de PA por el AcChR, fue la “*Recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueo*” o FRAP. Sin embargo, los datos obtenidos mediante estos experimentos no son directamente comparables con los anteriormente mencionados de calorimetría, fluorescencia o infrarrojo. El motivo fundamental estriba en el tipo de muestras utilizadas, siendo muy diferentes en el caso de FRAP. Se trata de muestras en las que la relación molar lípido-proteína es mucho mayor, en torno a 55.000, ya que sólo a estas relaciones se forman superficies homogéneas de tamaño apropiado para utilizar esta técnica. Además, en el proceso de formación de estas multicapas se somete a la muestra a un ciclo de deshidratación-hidratación cuyos efectos sobre la proteína y el dominio son desconocidos. Pese a todas estas diferencias, las curvas de FRAP obtenidas para la muestra de DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 25:50:25) con el AcChR marcado con FITC muestran que un 27.8% de proteína está inmovilizada, mientras que el resto, un 72.2%, se mueve con un coeficiente de difusión de 10^{-8} cm²/s, muy próximo, aunque menor, al establecido en trabajos anteriores para el AcChR en membranas lipídicas en fase líquido-cristalina (Criado et al., 1982). En el caso de que la proteína difundiera libremente, la recuperación de la fluorescencia sería del 100% y la disminución en esa recuperación significa que hay una población de AcChR, el 27.8%, que no difunde libremente. La interpretación de estos datos no es inequívoca, pudiendo responder al menos a dos esquemas diferentes: pudieran existir dos poblaciones de proteína, una fuera del dominio que difundiría libremente y otra que estaría atrapada en el mismo. Sin embargo, no se puede descartar que todas las moléculas de AcChR estén rodeadas por dominios más o menos grandes de DMPA que no les impedirían difundir libremente, pero sólo un 27.8% formarían parte de un supradominio formado por un gran número de moléculas de AcChR y DMPA en el que la proteína estaría inmovilizada y que sería el responsable de la transición de fase detectada por FT-IR, anisotropía de fluorescencia y calorimetría. Esta distribución no tiene por qué ser fija y quizás es dependiente de la relación lípido-proteína utilizada, por lo que no tiene por qué ser un esquema cuantitativamente trasladable a las muestras utilizadas en el resto de experimentos.

Composición del dominio: presencia del Colesterol

Muchos de los experimentos comentados anteriormente ponen de relieve la existencia de una diferencia sustancial entre la transición de fase del DMPA puro y el DMPA segregado por el AcChR en matrices de composición compleja, sobre todo en cuanto a los valores de T_m y de entalpía de transición. Un componente de las vesículas en las que se produce la segregación del dominio, el colesterol, produce cuando es añadido en fases lipídicas puras, una disminución de la T_m y entalpía de transición de las mismas (Blume, 1988; Blume y Hillmann, 1986), efecto similar al que se ha observado en el dominio de DMPA segregado por el AcChR. Los experimentos realizados mediante anisotropía de fluorescencia con *t*-PnA como sonda, los de exGP de Laurdan o los de DSC, indican que efectivamente el colesterol está incluido en este dominio segregado por el AcChR. De hecho, si este lípido no está presente en las vesículas, se obtienen transiciones de fase a mayor temperatura y con mayor entalpía. Además, los valores de anisotropía de fluorescencia son menores a baja temperatura en presencia de colesterol (efecto de desorden), mientras que a alta temperatura son mayores (efecto de inmovilización), acciones ya demostradas para este lípido en matrices de lípidos puros (Houslay y Stanley, 1982, Dergunov et al., 1997; Ben-Yashar y Barenholz, 1989). Sin embargo, estos cambios producidos por el colesterol son bastante pequeños comparados con los ya publicados previamente (Houslay y Stanley, 1982; Blume y Hillmann, 1986). Pudiera ser que el porcentaje de colesterol en el dominio fuera muy pequeño. Sin embargo, a tenor de los resultados obtenidos, no queda claro que el colesterol sea el único responsable de la perturbación de la transición de fase del DMPA segregado por el AcChR. Las muestras sin colesterol siguen presentando transiciones de fase con bajas T_m y termogramas muy alterados. La inclusión de PC de huevo en el dominio también podría estar afectando a la transición de fase. Asimismo, la simple presencia del AcChR en matrices de DMPA ya produce una alteración en la T_m , si bien es dependiente de la relación molar fosfolípido/proteína: a 3500 produce una subida de la T_m , sin efecto aparente sobre la entalpía, y a 150, condición más parecida a la del DMPA en el dominio, una disminución de la misma. Hay muchos trabajos que indican una disminución de la T_m de los lípidos que se encuentran alrededor de proteínas transmembrana (Heyn et al. 1981; Jaworsky y Mendelsohn, 1985, 1986; Bhushan y McNamee, 1990; Dergunov et al., 1997). En este caso, al tratarse de matrices compuestas sólo por DMPA, tendremos una transición de fase del DMPA afectado por la proteína y del DMPA no afectado por la proteína. Así, la T_m y la entalpía sería un promedio de estas dos poblaciones, lo que hace que este tipo de muestras con DMPA como único componente lipídico no sean una buena referencia respecto a las que se componen de DMPA y PC de huevo para evaluar el efecto de la PC de huevo sobre la T_m y entalpía del dominio segregado por el AcChR. Es difícil

establecer paralelismos entre estos sistemas de diferente composición, en los cuales el dominio no tendría porqué ser equivalente, si bien todo parece indicar que la suma de los efectos del colesterol, PC de huevo y AcChR alteran de forma considerable la transición de fase del DMPA. Probablemente el solapamiento de unos efectos sobre el resto hace difícil evaluar el efecto individual de cada uno de ellos, por lo que es imposible hacer un cálculo cuantitativo de la composición lipídica del dominio.

Una conclusión importante de estos resultados es que el colesterol no es fundamental para que tenga lugar la segregación del dominio por parte del AcChR, aunque si está presente, quedará incluido en el dominio, al contrario de lo que sucede con la rodopsina (Polozova y Litman, 2000). En ese trabajo se deduce que la propiedad del colesterol de favorecer la segregación de lípidos saturados de los no saturados explicaría su papel fundamental en la formación de los dominios. Trasladado al caso del AcChR, esta característica del colesterol podría contribuir a su segregación junto al DMPA ya que se trata de un fosfolípido con las cadenas saturadas, si bien parece poco probable pues como ya se ha comentado no es necesaria su presencia para la formación del dominio y por las estimaciones antes comentadas no parece que el dominio esté enriquecido en colesterol respecto al resto de la membrana.

Otra aproximación para el establecimiento de la composición del dominio sería la de intentar reproducir la transición de fase del DMPA segregado por el AcChR a partir de matrices sin proteína de DMPA puro, a la que se le fueran añadiendo cantidades constantes de PC de huevo y colesterol como posibles componentes minoritarios del dominio. Los experimentos de DSC indican que la inclusión de PC de huevo en DMPA puro provoca una disminución grande de la entalpía de transición, pero no así de la T_m . Esto indicaría que este fosfolípido no es el responsable de la baja T_m de las muestras de DMPA:PC+AcChR, sino que lo ha de ser la propia proteína. La inclusión de colesterol sí que produce una disminución adicional de la T_m , obteniéndose finalmente una transición de fase muy parecida a la del dominio con una composición lipídica de: 90% DMPA, 10% PC de huevo y 20% colesterol. Si esta fuera la composición real del dominio, significaría que la segregación del DMPA sería fundamentalmente respecto al PC de huevo, y que el colesterol quedaría repartido de manera prácticamente homogénea entre el dominio y los lípidos fuera de él, ya que el porcentaje de colesterol en las vesículas es del 25%. Atendiendo a estos números el dominio se vería enriquecido unas 18 veces en PA respecto a la mezcla homogénea de los componentes, bastante más que en el dominio detectado en la rodopsina para un fosfolípido insaturado que fue de 6 (Polozova y Litman, 2000). Sin embargo, este cálculo no deja de ser especulativo, ya que no tiene en cuenta la contribución del AcChR en la alteración de la transición de fase, si bien pone de manifiesto que la simple segregación incompleta del DMPA podría explicar la alteración en su transición de fase.

Puesto que el colesterol parece necesario para la función correcta del AcChR (Criado et al, 1984; Fong y McNamee, 1986), y su unión a los sitios no anulares de la interfase lípido/AcChR ha sido demostrada (Jones y McNamee, 1988), su presencia en el dominio de PA podría tener importantes consecuencias funcionales.

Alteración de las propiedades del DMPA en el dominio

De los resultados anteriormente comentados, queda claro que el dominio segregado por el AcChR está formado mayoritariamente por DMPA y que este fosfolípido tiene alterada su transición de fase, posiblemente por la presencia de PC de huevo, pero sobretudo por la de la propia proteína y la del colesterol. También hay experimentos que indicarían un estado alterado del pK_a del PA y una posible deshidratación del mismo. Por esta razón se trató de evaluar hasta qué punto estaban afectadas las propiedades del DMPA en el dominio. Una de las características de este fosfolípido es la sensibilidad al pH de su transición de fase. Ello es debido a que un aumento en la carga del fosfato del PA da lugar a una desestabilización de su empaquetamiento causada por la alteración de los puentes de hidrógeno de este grupo con el agua, y por repulsiones entre las moléculas de PA, lo que se traduce finalmente en una disminución de la T_m , sobretudo cuando se pierde el segundo protón del fosfato (Eibl y Blume, 1979; van Dijck et al., 1978). La ligera tendencia a disminuir la T_m en el DMPA puro al aumentar el pH entre 4 y 9 debido a la desprotonación del fosfato, se ve invertida en el caso del DMPA segregado en el dominio. La razón para este cambio podría ser un aumento en el pK_a de los fosfatos del DMPA por la interacción de este fosfolípido con el AcChR, cuestión que ya se ha discutido con anterioridad. En este caso se estabilizaría la forma monoaniónica de los mismos, lo que impediría la disminución de la T_m , provocada por la aparición de la forma dianiónica del DMPA a alto pH. También es posible que haya una disminución del pK_a que favorezca la forma dianiónica a bajos pHs con lo que la T_m ya no bajaría al aumentar el pH. Los datos obtenidos con FT-IR del grupo fosfato y carbonilo apoyarían la primera de estas hipótesis. La interacción directa de residuos del AcChR con el grupo fosfato del PA también podrían imposibilitar el efecto del pH. Otra alternativa sería una distribución asimétrica del PA en el dominio en las dos hemicapas de la membrana. Está generalmente aceptado que muchas membranas biológicas exhiben distribución asimétrica de lípidos (Op den Kamp, 1979; van Deenen, 1981), por lo que si el PA estuviera fundamentalmente en el interior de las vesículas lipídicas, el cambio de pH en el exterior no debería afectar demasiado a la T_m . En este sentido, estudios de fluorescencia aseguran que hay una distribución preferente de PC y PE marcados con NBD en la hemicapa externa de membranas ricas en AcChR provenientes de Torpedo

marmorata (Gutiérrez-Merino et al., 1995). Sin embargo, los resultados obtenidos en los estudios de diferentes dominios en vesículas tipo *GUV* siempre han sido de simetría entre las hemicapas (Dietrich et al., 2001; Bagatolli y Gratton, 2000; Korlach et al., 1999).

De los termogramas obtenidos por DSC a diferentes pHs, también se puede observar que a altos valores del mismo, 8 y 9, parece que el área de la endoterma de transición de fase es menor. Si la formación del dominio estuviera favorecida por la carga dianiónica del PA, encontraríamos que la endoterma sería mayor al aumentar el pH. Este resultado podría indicar que el aumento de carga desfavorece la formación del dominio, como también se desprende de los experimentos de reconstitución o rereconstitución a pH 10, si bien en este último caso, debido a la desestabilización de dominio que produce la segunda reconstitución, independientemente del pH que se utilice, es complicado sacar conclusiones definitivas. Además a este pH se ha detectado por FT-IR algo de desnaturalización en el AcChR (Méthot y Baenziger, 1998), aunque este proceso no parece eliminar el dominio según se ha visto en DSC. Por tanto, se pone otra vez de relieve el factor electrostático como modulador en la segregación, siendo aparentemente la forma monoaniónica del PA la que se segrega preferentemente en el dominio. Aún así, hay que recordar que la transición de fase no sólo depende del número de moléculas que la experimentan sino también de las condiciones del experimento como el pH, por lo que no se puede establecer una relación directa entre el efecto del pH sobre la endoterma de transición y el número de moléculas involucradas en este proceso. En cuanto a la hipótesis de la asimetría del PA, también podría cuadrar con estos resultados. Se ha establecido en diferentes estudios que un gradiente de pH afecta fuertemente la distribución de los fosfolípidos entre las hemicapas de una membrana (Eastman et al., 1991; Hope et al., 1989). En estos experimentos el gradiente se formaría porque el cambio de pH se realiza por centrifugación y resuspensión, a partir de vesículas formadas por un proceso de diálisis a pH 7.4. Por tanto el interior se quedará a pH 7.4 y el exterior al pH del tampón de resuspensión. En muestras con un pH externo alto, puesto que el pH interno es siempre 7.4, se favorece un gradiente de PA hacia el exterior de las vesículas (Eastman et al., 1991) que podría derivar en un menor número de moléculas de este fosfolípido en el dominio, y de ahí la menor endoterma obtenida por DSC.

Otra característica del DMPA que queda alterada al formar parte del dominio es su interacción con el calcio. Éste produce, cuando se encuentra en exceso, la desaparición de la transición de fase de este fosfolípido (Laroche et al., 1991), posiblemente por la desorganización de las bicapas y la conversión a estructuras cilíndricas lamelares altamente empaquetadas que precipitan en agua (Verkleij et al., 1979; Van Dijck et al., 1978). Los experimentos de calorimetría con DMPA puro

confirman estos resultados, observándose un precipitado blanco tras la adición del calcio, a cualquiera de los pH probados. Por otro lado, en mezclas de fosfolípidos sintéticos de PC y PA a alto pH, el calcio produce la segregación de este último aunque sin transición de fase (Jacobson y Papahadjopoulos, 1975; Kouaouci et al., 1985). A la misma relación calcio-DMPA, para las que el DMPA puro precipita perdiendo su transición de fase, el dominio sigue presentando una transición de fase en los experimentos por DSC, si bien una mayor adición de calcio sí que la elimina, aunque no se sabe si también desaparece la segregación del dominio. Hay varias explicaciones a este comportamiento por el que el DMPA del dominio tiene menor afinidad por el calcio. Una posibilidad es la inclusión en el dominio de PC de huevo y colesterol, si bien en muestras de DMPA:PC de huevo:Col (relación molar 90:10:20), que podrían simular la composición del dominio, el calcio sí que elimina la transición de fase del DMPA, por lo que no parece la causa principal. Por otro lado, si como indican algunos experimentos ya comentados anteriormente, el pK_a del PA en el dominio es superior al del PA puro, favoreciendo así la forma monoaniónica, la interacción con el calcio se vería reducida y de ahí que la transición de fase esté aún presente a no ser que se añada más calcio. También es posible una interacción directa de los tramos extramembrana del AcChR con los grupos polares del PA segregado dificultando así la interacción con el calcio. Un tercer factor a tener en cuenta es la simetría del PA en el dominio entre las dos hemicapas. Es posible que este fosfolípido se encuentre mayoritariamente en la hemicapa interior de las vesículas impidiendo así la interacción con el calcio. En todos estos casos, una mayor concentración de calcio promovería de alguna manera el desequilibrio en el sistema de tal manera que se produciría una interacción directa entre el PA y este catión para que desaparezca la transición de fase. Así, a altas concentraciones el calcio puede inducir la fusión de vesículas (Sundler y Papahadjopoulos, 1981) lo que facilitaría su entrada al interior de las mismas con la consiguiente interacción con el PA de la hemicapa interna de la membrana. En estos experimentos se ha usado una relación calcio-DMPA fija, pero en las muestras con AcChR y dominio hay una gran cantidad de moléculas a parte del DMPA como otros lípidos y la propia proteína, que podrían competir de alguna manera por el calcio, necesitándose por tanto una mayor concentración del mismo para eliminar la transición. Es decir, la concentración efectiva del calcio en relación al DMPA sería menor que la añadida a la muestra.

Pese a que el calcio no elimina inicialmente la transición de fase del dominio, en su presencia, el efecto del pH sobre la transición de fase del DMPA en el dominio sí que es el esperado para el DMPA puro, con una disminución de la T_m con el pH describiendo una sigmoide cuyo punto de inflexión está alrededor de pH 7.4. Es como si el PA del dominio hubiera recuperado el pK_a del PA puro. Además a pH alto y en

presencia del calcio, la transición de fase se hace más ancha, es decir, el proceso pierde cooperatividad. Es posible que el simple aumento de la fuerza iónica, producido al añadir el cloruro de calcio de lugar a un aumento en el pK_a del PA como ya se ha demostrado en muestras de DMPA puro (van Dijck et al., 1978), favoreciéndose así la doble carga del fosfato que desestabiliza el dominio y de ahí el descenso en la T_m y cooperatividad a alto pH. En cuanto a la hipótesis de la distribución asimétrica del PA, la presencia de calcio o ese aumento de la fuerza iónica habría de alterar esta asimetría de tal forma que el PA pasara a estar fuera con lo que el pH sí que afecte su grado de ionización. En cualquiera de estos casos habría que suponer que la concentración efectiva del calcio es pequeña como se ha discutido anteriormente, ya que si el PA realmente recupera su pK_a o se trasloca a la cara externa de las vesículas, la interacción con el calcio debería eliminar la transición de fase o en todo caso aumentar la T_m de la misma (Laroche et al., 1991). La interacción de los tramos extramembrana también podría contribuir a la protección del PA respecto al calcio.

Los experimentos de anisotropía de fluorescencia con un exceso de calcio mayor incluso al utilizado en los experimentos de DSC, en los cuales la transición de fase quedaba eliminada, y a pH 7.4, no producen ningún efecto sobre el dominio segregado. De alguna manera, el DMPA queda más protegido de la interacción con el calcio. Una explicación a este fenómeno podría derivarse de la diferente concentración de lípido usado en calorimetría y fluorescencia. En el primer caso habrá muchas vesículas y muy concentradas con lo que el contacto entre ellas y la fusión inducida, sobretudo en presencia de calcio, provocará que este catión pueda interactuar con el DMPA de la hemicapa interna de las vesículas posibilitando así la desaparición de la transición de fase (Graham et al., 1985). Además, hay evidencias de que la unión del calcio al PA se realiza entre una molécula del primero y dos del segundo, estando estas últimas en dos bicapas vecinas (Portis et al., 1979). Para anisotropía de fluorescencia se utilizan muestras con muy poca concentración lipídica ya que las muestras han de tener poca dispersión de luz. Es posible que en estas condiciones el calcio no pueda interactuar efectivamente con el PA, ni inducir la fusión de las vesículas y por tanto no acceda al PA del interior de las mismas. Otra contribución a estas discrepancias entre los resultados podría ser la diferente relación molar fosfolípido/proteína que se utiliza en estos experimentos. En DSC esta relación es 3500, por lo que en base a la estequiometría calculada habría mucho DMPA no segregada en dominios. En ese caso, es posible que el calcio a muy altas concentraciones promueva la formación de dominios a partir de ese DMPA, los cuales no presentarían transición de fase (Jacobson y Papahadjopoulos, 1974; Kouaouci et al., 1985), alterando los ya formados por la proteína que sí desaparecerían con la adición de más calcio. Cuando la relación molar fosfolípido/proteína es 564 como en los experimentos de anisotropía, no debe de haber

prácticamente DMPA no segregado, y el que hay en los dominios posiblemente esté impedido para interactuar con el calcio. Este impedimento puede ser causado como ya se ha discutido por una variación del pK_a del PA, por la interacción con el AcChR, etc. También hay que tener en cuenta los termogramas obtenidos por DSC a baja y alta relación fosfolípido-AcChR, en los que se podía deducir una cierta reorganización lipídica que podría contribuir a este cambio en la interacción del PA segregado con el calcio.

El sistema es sumamente complejo y hay una gran cantidad de variables involucradas todas ellas interdependientes por lo que es muy difícil dar una explicación inequívoca a todos los resultados obtenidos. Pese a ello, el conjunto de estos experimentos pone de manifiesto que el DMPA segregado por el AcChR se comporta de una manera muy diferente al DMPA puro, presentando unas características físicas alteradas, posiblemente por la suma de las interacciones con la propia proteína, y la presencia de colesterol y PC de huevo en el dominio.

Localización del dominio

Tras caracterizar las propiedades del dominio, se abordó la localización del mismo. Es de suponer que el dominio de PA segregado cuando el AcChR está presente en vesículas de DMPA, PC de huevo y colesterol esté localizado alrededor de la proteína, ya que ésta tiene preferencia por el PA. Además la transición de fase y características físicas de este fosfolípido están muy alteradas en parte por la presencia del AcChR como ya se ha discutido anteriormente, lo que se explicaría más fácilmente si hubiera un contacto entre el receptor y el DMPA del dominio. Sin embargo, no es descartable que la situación sea la inversa y que el fosfolípido quede aislado de la proteína, puesto que experimentos realizados con proteínas que tienen preferencia por lípidos aniónicos en presencia de una mezcla de lípidos aniónicos y zwitteriónicos, con capacidad ambos de sufrir una transición de fase cooperativa con la temperatura, da lugar a una transición de fase de los lípidos zwitteriónicos. La explicación para estos resultados es que la proteína se une a los lípidos aniónicos impidiendo su cambio de fase, mientras que los lípidos zwitteriónicos quedarían segregados lejos de la proteína (Kouaouci et al., 1985; Graham et al., 1985). Para hallar la localización del dominio se realizaron experimentos de transferencia de energía por resonancia (RET) con el AcChR como donador de fluorescencia y dos sondas hidrofóbicas (DPH y *t*-PnA) que se localizan en la membrana lipídica como aceptores de la misma. La fluorescencia es muy sensible a la formación de dominios ya que el menor tiempo de vida de un dominio detectado será aproximadamente la vida media del estado excitado del fluoróforo, es decir en la escala de 10^{-8} s. La resolución espacial es aproximadamente igual al radio de Förster del par aceptor-donador, es decir, entre 10 y 100 Å. Por ello, este tipo de

aproximación, aunque con otras sondas, ha sido realizada también en estudios anteriores para detectar separación lateral de lípidos inducida por proteínas (Polozov et al., 1997; Antollini et al., 1996; Polozova y Litman, 2000).

El AcChR tiene 51 triptófanos por molécula (Noda et al., 1983), aunque estudios de apagamiento de fluorescencia con fosfolípidos marcados con sondas tipo spin, asignan un 30% de la fluorescencia de la proteína al triptófano 453 de la subunidad γ situado en la el segmento transmembrana M4 del AcChR, el más próximo a los lípidos de la membrana. (Chattopadhyay y McNamee, 1991). Otros estudios realizados también con la misma técnica asignan a este residuo un 80% de la fluorescencia (London y Feigenson, 1981; Chattopadhyay y London, 1987). Por tanto, la fluorescencia del donador (AcChR) es una suma ponderada de la proveniente de una gran cantidad de residuos distribuidos por toda la proteína. Esto supone una gran complejidad a la hora de tratar los datos obtenidos por RET, ya que en realidad se obtendría una distancia media de los aceptores a todos esos donadores de fluorescencia. Además, se desconoce el rendimiento cuántico de cada uno de esos residuos, por lo que los datos que se puedan calcular no aportarían la distancia exacta entre el donador y aceptor. Por estas razones, se optó, más que por hallar distancias concretas, por comparar los datos obtenidos mediante estos experimentos con dos sondas aceptoras, DPH y *t*-PnA, asumiendo las mismas suposiciones para ambas respecto a la fluorescencia del donador. Puesto que estas sondas son hidrofóbicas, se incluirán en la membrana lipídica con lo que podrán localizarse en cualquier punto de un plano bidimensional (el que forma la membrana) alrededor de la proteína. Por tanto, la transferencia de energía tendrá lugar entre el donador y las sondas a diferentes distancias, es decir, será una suma de diferentes transferencias de energía, lo que sólo se puede analizar utilizando un modelo de RET en dos dimensiones como el de Gutiérrez-Merino (Gutiérrez-Merino, 1981), que además en la versión utilizada está desarrollado para el caso concreto del AcChR en una membrana lipídica. Este modelo ha sido aplicado anteriormente en esta y otras proteínas de membrana (Antollini et al., 1996; Gutiérrez-Merino et al., 1994, 1995).

Asumiendo las distintas suposiciones que se hacen en este modelo y que la sonda DPH se reparte homogéneamente en la membrana lipídica en la que el AcChR está reconstituido, pues esta sonda no tiene preferencias por fases tipo gel o líquido-cristalino (Lentz et al., 1976), el análisis de los datos obtenidos mediante los experimentos de RET da un valor de K_r para la sonda *t*-PnA de 0.6. Un valor de K_r inferior a la unidad es indicativo de una distribución preferente de esta sonda en las proximidades del AcChR. Este valor de K_r se obtiene cuando esta proteína está reconstituida en vesículas de DMPA:PC de huevo:Col, en las que se detecta la segregación de un dominio lipídico. Sin embargo, en este mismo tipo de análisis

realizado en muestras sin dominio como es el caso de vesículas de DMPC:PC de huevo:Col con AcChR, se obtiene un Kr para *t*-PnA de 1, es decir una distribución homogénea de la sonda alrededor de la proteína. Estos experimentos de RET indican claramente que esta sonda se distribuye preferentemente cerca del AcChR sólo cuando éste es capaz de segregar un dominio lipídico. Por otro lado, el *t*-PnA, según los datos de anisotropía de fluorescencia, se reparte mayoritariamente en el dominio cuando éste está en fase gel, como es el caso de estos experimentos realizados a 20 °C. Estos dos resultados señalan inequívocamente una localización del dominio en las proximidades del AcChR. El hecho de que el AcChR altere de forma notable la transición de fase del dominio de DMPA como indican los experimentos de anisotropía de fluorescencia también apoya una localización próxima del dominio respecto a la proteína. Resultados similares mediante RET se han obtenido con la rodopsina y un lípido insaturado marcado fluorescentemente, que resultó estar preferentemente distribuido cerca de esta proteína respecto a otro fosfolípido saturado (Polozova y Litman, 2000). En el caso del AcChR y el Laurdan no se halló ninguna preferencia de esta sonda por las cercanías de la proteína (Antollini et al., 1996) si bien esta sonda se reparte homogéneamente en fases fluidas y líquido-cristalino (Parasassi et al., 1990) y además el experimento se realizó en membranas naturales donde no es de esperar un cambio de fase demasiado grande entre los lípidos en un posible dominio lipídico alrededor de la proteína y el resto.

Los resultados obtenidos mediante FRAP también apuntan en el mismo sentido, es decir, a una localización del AcChR dentro de los dominios de DMPA, ya que en caso contrario sería muy difícil justificar la existencia de un alto porcentaje de la proteína que no difunde libremente en la membrana como se ha comentado anteriormente en este mismo capítulo (ver “*Estudio del dominio mediante FRAP*”). De igual modo se pueden interpretar los datos de FT-IR en los que el AcChR provoca un aumento de confórmeros *gauche* en muestras en las que se segrega DMPA, fenómeno que no ocurre cuando se sustituye el DMPA por DMPC, fosfolípido que no sufre segregación alguna (resultados ya discutidos en el apartado “*Estudio del dominio mediante FT-IR*” de este capítulo). Sería difícil explicar este resultado si no hay una interacción directa, y por tanto colocalización del DMPA segregado y el AcChR.

Factores implicados en la formación del dominio

En el estudio de un dominio lipídico una cuestión fundamental es la de encontrar una explicación del porqué se produce la formación del mismo. Hay una gran cantidad de estudios en los que se ha descrito la formación de dominios lipídicos por parte de péptidos, naturales o sintéticos, o proteínas que se unen superficialmente a la membrana, en vesículas artificiales o en membranas naturales (Wang et al., 1993; Bazzi

y Nelsestuen, 1991; Haverstick y Glaser, 1989; Désormeaux et al., 1992; Rytömaa y Kinnunen, 1996). En todos ellos, la interacción se produce entre proteínas con alto contenido en residuos de carácter básico y fosfolípidos aniónicos (PA, PG o PS), por lo que la atracción electrostática se supone como origen de estos dominios, si bien no se hace ningún estudio exhaustivo para comprobar si realmente es ésta la única interacción implicada. Para el caso del AcChR, puesto que el dominio se sitúa en sus proximidades, ha de haber ciertas interacciones entre la proteína y los lípidos segregados que venzan la mezcla homogénea de los componentes en la membrana lipídica, fenómeno entrópicamente más favorable. Parece razonable que un factor determinante en la formación del dominio podría ser la alta afinidad que presenta el PA por el AcChR (Marsh y Barrantes, 1978; Ellena et al., 1983; Esmann y Marsh, 1985; Jones y McNamee, 1988; Dreger et al., 1997). Este argumento es el único esgrimido en el caso del dominio detectado en la rodopsina (Polozova y Litman, 2000). En el trabajo de Denisov et al., 1998, se muestra que la unión de péptidos de carácter básico a membranas, produce la formación de dominios enriquecidos en PA. Estos autores explican sus resultados en base a interacciones electrostáticas, por las que el descenso en la densidad de carga de la membrana que acompaña a la unión de PA a los péptidos, provoca una disminución suficiente de la energía libre electrostática como para superar la energía libre de mezcla de fosfolípidos neutros y aniónicos, resultando de esta forma en un descenso general de la energía libre del sistema que favorecería la formación del dominio. Esta hipótesis estaría apoyada por los datos de FT-IR del grupo fosfato en los que se encuentra un aumento de la especie monoaniónica frente a la dianiónica cuando el AcChR está presente. En mezclas de DMPA y DMPC, se ha demostrado que puede haber inmiscibilidad de fases fluidas a bajo pH, es decir, a baja ionización del PA, posiblemente por la reducción de la repulsión electrostática y al correspondiente incremento de las interacciones atractivas por puente de hidrógeno (Garidel et al, 1997).

Segmentos transmembrana del AcChR

Estudios de fotomarcaje dirigidos a identificar las regiones de la proteína expuestas a los lípidos (Blanton y Wang, 1990; Blanton y Cohen, 1992; Blanton y Cohen, 1994), concluyen que es el segmento M4 de las subunidades que forman el receptor el que queda más eficazmente marcado por un derivado fotoactivable de la fosfatidilserina. Este segmento M4 en cada una de las subunidades está flanqueado por cargas positivas, de acuerdo con los modelos de organización transmembrana (Noda et al., 1983), situadas al nivel de los grupos polares de los fosfolípidos, cerca de la superficie de membrana. Además se han realizado estudios de mutagénesis dirigida de este segmento transmembrana de los que se han extraído información sobre los aminoácidos que interaccionan con los lípidos y aquellos que posiblemente

interaccionan con otros segmentos transmembrana del AcChR (Tamamizu et al, 2000). Para éstos últimos, su mutación produce un descenso en la expresión del receptor, lo que confirma su papel en el ensamblaje de la proteína. Dentro de los aminoácidos que interaccionan con los lípidos, se han identificado dos que los autores de este trabajo designan como sitios alostéricos hidrofóbicos, ya que su mutación altera en gran medida la funcionalidad del canal. De la periodicidad en los efectos de las mutaciones y del fotomarcaje se concluye que el segmento M4 está formado por una α -hélice (Tamamizu et al., 2000; Blanton y Cohen, 1994), si bien podría estar algo inclinada respecto a la perpendicular de la bicapa (Barrantes et al., 2000; Ortells y Lunt, 1996). También mediante estudios de intercambio de hidrógeno por deuterio con FT-IR se ha sugerido este tipo de estructura (Baenziger y Méthot, 1995; Méthot y Baenziger, 1998). En base a todos estos resultados se propone en esta memoria un modelo de los segmentos M4 de las cinco subunidades del AcChR (**figura 1**), cada uno formado por una hélice alfa con una orientación determinada por la de los aminoácidos que interaccionan con los lípidos o con otros segmentos transmembrana. En este modelo, se ha partido de los datos obtenidos con los residuos de la subunidad α y se ha supuesto una orientación equivalente en el resto de las subunidades para las que apenas hay datos, una vez alineadas las secuencias. Esto parece lógico, atendiendo a la equivalencia entre las distintas subunidades (ver *Introducción*). En la secuencia aminoacídica de estos tramos transmembrana (**figura 2**), la distribución de cargas en la parte citoplasmática (extremo N-terminal) de las hélices es siempre la misma: un residuo con carga negativa más al extremo y luego uno con carga positiva, hacia el centro de la hélice. En el lado extracitoplásmico (C-terminal) el patrón no es tan regular, aunque hay siempre, a mayor o menor distancia, un residuo con carga positiva. Por tanto, en términos globales, hay más carga positiva en los extremos de los M4, si bien el pK_a de la cadena lateral de todos estos residuos pueden resultar muy alterado dependiendo del entorno en los que se encuentren, por lo que no es seguro que estén todos cargados.

En el modelo se puede observar que efectivamente hay una correspondencia entre la orientación de los aminoácidos y su interacción con los lípidos u otros segmentos transmembrana, lo que apoya la estructura en hélice α de estos segmentos. Incluso la cisteína del segmento M4 de la subunidad γ implicada en la unión a colesterol (Narayanaswami y McNamee, 1993) queda orientada hacia un intersticio entre dos tramos transmembrana, sitio propuesto para la localización de los sitios no anulares (Jones y McNamee, 1988). Asimismo, las cargas positivas están orientadas mayoritariamente hacia los lípidos y en cualquier caso están más cerca de éstos que las cargas negativas, por lo que posiblemente puedan interaccionar con el grupo fosfato del PA, mediante atracción electrostática o puentes de hidrógeno.

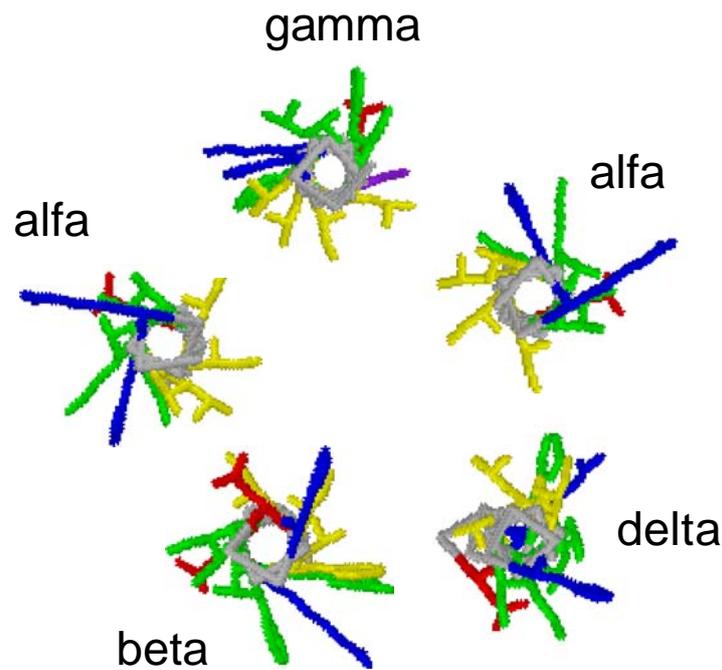


Figura 1. Modelo de los segmentos M4 transmembrana del AcChR de *Torpedo Marmorata*. El modelo se ha generado con el programa HyperChem™ a partir de la secuencia primaria de los segmentos transmembrana M4 del AcChR, tomados como hélices α . El código utilizado para la coloración fue: amarillo, residuos en contacto con otros tramos transmembrana; verde, residuos en contacto con lípido; azul, residuos cargados positivamente; rojo, residuos cargados negativamente; violeta, cisteína en contacto con el colesterol; esqueleto en gris.

VIDHILLCVFM ^{LI} CI ^{IGT} VSVFAGRLI	alfa
VADRLFLYVFFVICS ^{IGT} FSIFLDASH	beta
VIDKACFWIALLLFS ^{IGT} LAIFLTGHF	gamma
TIDRLSMFIIT ^{PVM} VLGTIFIFVMGNFNH	delta

Figura 2. Secuencia aminoacídica de los segmentos M4. Se muestran las secuencias de aminoácidos en códigos de una letra de los segmentos M4 de las 5 subunidades del AcChR. Se han considerado como parte de las hélices α los aminoácidos ya predichos en anteriores modelos a los que se han añadido, en ambos extremos, los necesarios hasta encontrar un aminoácido con carga positiva. Cada secuencia ha sido alineada respecto a la de la subunidad α y está dispuesta de izquierda a derecha desde el lado N al C terminal, correspondiendo este último al lado extracitoplasmático del segmento M4. Los códigos de colores son los mismos que en la figura 1.

Los residuos con carga positiva, especialmente los de arginina o lisina, están implicados en fijar la posición de las hélices transmembrana (de Planque et al., 1999; von Heijne y Gavel, 1988; Gavel y von Heijne, 1992), y en este caso pudieran hacer ese papel también, con más probabilidad en el lado citoplásmico donde se sitúan en todas

las subunidades en posiciones equivalentes. En el lado extracitoplásmico, esta función la podría realizar la fenilalanina (**figura 2**), ya que los residuos aromáticos se localizan en muchas proteínas de membrana en la interfase agua-lípido (Yuen et al., 2000).

Se ha calculado que el grupo amino de la lisina en péptidos sintéticos siempre se coloca a la altura del fosfato de los fosfolípidos de la membrana aunque se varíe la longitud del péptido o de la membrana (de Planque et al., 1999). Mediante análisis de estructuras de rayos X se ha llegado a la misma conclusión en otras proteínas (Wallin et al., 1997; Tsukihara et al., 1996; Iwata et al., 1998). Eso significaría que estos residuos quedarían en la interfase lípido-proteína, a una distancia próxima al grupo fosfato del PA. Por tanto, esos residuos cargados positivamente podrían interactuar con las cargas negativas de los grupos polares del PA, de una manera similar a la de los péptidos básicos estudiados por Denisov et al. (1998). También se ha propuesto interacciones entre el dipolo que resulta de la hélice α flanqueada por estos residuos cargados y los fosfatos del PA (Hol et al., 1978; Sali et al., 1988), lo que sería factible con este modelo. Sin embargo, experimentos a altas concentraciones de sales o diferentes pHs (entre 5 y 9) usando análogos de fosfolípidos con sondas de spin, concluyen que en el AcChR (Raines y Miller, 1993), como en otras proteínas integrales de membrana (Esmann et al., 1985; Horvath et al., 1988), las interacciones electrostáticas no son suficientes para explicar la selectividad de unión del PA. En el trabajo referido al AcChR se justifica esta independencia de la carga en la interacción lípido-proteína por una supuesta compensación de cargas positivas y negativas en M1 y M4, aunque no se tuvo en cuenta la localización de las mismas. Los resultados obtenidos con el dominio de PA a diferentes pHs en los que la carga del fosfolípido debía de haberse alterado indicarían igualmente que la carga electrostática no es fundamental en el proceso. Aún así, como ya se ha comentado anteriormente, el pK_a del PA en el dominio podría estar alterado con lo que en el intervalo de pH probado la carga del PA pudiera no variar demasiado. Bhushan y McNamee, en un trabajo publicado en 1993, no pudieron titular el grupo fosfato del DOPA ni en presencia ni en ausencia del AcChR con NaCl hasta 1 M, es decir, parece que la fuerza iónica no tiene demasiado efecto sobre el estado iónico de los grupos que se encuentran en la interfase lípido-agua. Esto podría justificar el porqué la unión preferente de fosfolípidos aniónicos al AcChR medida por ESR (Ellena et al., 1983) no varía con la fuerza iónica. Los resultados obtenidos en esta memoria en los que se varía el pH o la fuerza iónica en el mismo proceso de reconstitución sí que dan un papel fundamental a las interacciones electrostáticas en la formación del dominio. Además, el hecho de que a pH 10 no se forme el dominio apoya la disminución del pK_a del PA en el dominio. La posible justificación a la obtención de datos contrapuestos según se realicen los experimentos con el dominio ya formado o no, sería la existencia de una barrera de energía muy alta

para eliminar el dominio aunque se encuentre en condiciones desfavorables para la formación del mismo, posiblemente porque en dicho proceso el PA quede alterado en sus propiedades químico-físicas.

Cabeza polar de los fosfolípidos

Los experimentos de DSC en muestras de AcChR reconstituido en PC de huevo, colesterol y fosfolípidos aniónicos distintos a PA, como PG o PS sugieren que el fenómeno de la segregación no depende solamente de que el fosfolípido en cuestión tenga una carga negativa, sino que hay un componente exclusivo del PA, si bien esto no quiere decir que no haga falta la carga negativa. La exclusividad del PA frente a otros fosfolípidos aniónicos en la formación de dominios o en la afinidad en la unión a proteínas ya se ha encontrado en otros casos (Luan et al., 1995; Carsten et al., 1999). El grupo aspartato, con carga negativa, adyacente a la carga positiva que se encuentra en la parte citoplasmática de todos los segmentos transmembrana M4, pudiera intervenir en la afinidad exclusiva del PA respecto a otros fosfolípidos. El PA a diferencia del resto de fosfolípidos probados, no tiene unido al grupo fosfato ninguna molécula, por lo que sería muy difícil que tuviera una interacción con el residuo de aspartato si es que ya está interaccionando con el residuo con carga positiva correspondiente. Sin embargo, los grupos serina, colina o glicerol del PS, PC o PG respectivamente sí que podrían perturbar este grupo desfavoreciendo la unión de estos fosfolípidos al AcChR. Además el PA tiene características únicas como su alta capacidad para formar puentes de hidrógeno, su diferente disposición en estructuras cristalinas respecto a otros fosfolípidos (Gennis, 1989), o su cabeza polar de pequeño tamaño que da lugar a una condensación que a su vez deriva en un mayor orden y menor fluidez (Salmon et al., 1987), factores que podrían contribuir en mayor o menor medida a este comportamiento exclusivo.

El segmento transmembrana M4 no es el único que interacciona con los lípidos, ya que tanto el segmento M1 como el M3 son marcados en mayor o menor medida por sondas lipídicas (Blanton y Cohen, 1994; Blanton y Cohen, 1992), por lo que podrían intervenir también en la interacción con el PA. De hecho, el segmento M3 y más concretamente un grupo de cargas positivas en su extremo citoplásmico ha sido propuesto como un sitio de interacción con los lípidos aniónicos (Butler y McNamee, 1993). Por último, los segmentos extramembrana según ha quedado patente en diferentes resultados a lo largo de esta memoria, podrían contribuir mediante una interacción directa con los grupos polares del PA a la formación y estabilidad de este dominio. En cualquier caso, debido a lo extenso de este dominio es segura la intervención de fuerzas electrostáticas y de otra naturaleza en la interacción entre las propias moléculas de PA para formar este dominio.

Cadenas alifáticas de los fosfolípidos

En los experimentos con diferentes fosfolípidos, todos están dimiristoilados como el PA, por lo que también descartan la posibilidad de que el dominio se forme por un mejor ajuste en la longitud de los segmentos transmembrana del AcChR con las cadenas de las ácidos del DMPA respecto al resto de los fosfolípidos (PC de huevo) de la membrana. Este fenómeno es el origen en algunos casos de la segregación o unión preferencial de determinados fosfolípidos a péptidos o proteínas transmembrana (Zhang et al., 1992; Sperotto y Mouritsen, 1993; Sabra y Mouritsen, 1998; Rinia et al., 2000). La saturación y longitud de las cadenas acílicas de los fosfolípidos, como es el caso del DMPA, también está implicada en la formación de los “rafts” (Schütz et al., 2000; Wang et al., 2000), dominios formados principalmente por colesterol, esfingolípidos y fosfolípidos saturados (Simons e Ikonen, 1997). En la segregación del PA por parte del AcChR, parece que la saturación del fosfolípido no es fundamental.

Equilibrio Estado de reposo-Estado desensibilizado del AcChR

Si hay una serie de residuos en el AcChR responsables de la interacción con el PA, y la consecuente segregación del dominio, cualquier cambio que pueda afectar a la estructura de la proteína podría influir en ese proceso. La desensibilización del AcChR provoca cambios conformacionales en la proteína, aunque estos no están aún bien definidos. Por esta razón se evaluó el efecto de una presencia continuada de carbamilcolina, que provoca la desensibilización del AcChR, sobre la segregación del dominio de PA. El hecho de no quedar alterado implica que este cambio conformacional no afecta de manera importante las interacciones responsables de mantener el dominio alrededor del AcChR, lo que significa que los residuos implicados en dichas interacciones no deben de cambiar mucho su posición durante el proceso de la desensibilización. De hecho las hipótesis más aceptadas en cuanto a los cambios conformacionales que supone este proceso indican que los movimientos serían muy pequeños y limitados, como giros de los segmentos transmembrana o cambios en la orientación de los mismos, sin afectar en gran manera a la estructura de la proteína (Unwin, 1995; Baenziger y Chew, 1997), limitándose en todo caso a las hélices α que forman el poro iónico, segmentos M2, sin afectar a los segmentos en contacto con los lípidos (Blanton y Cohen, 1994). La relación entre el estado conformacional del AcChR y las interacciones lípido-proteína también se han estudiado mediante ESR, llegándose a la misma conclusión: no hay una interconexión entre ambos fenómenos (Dreger et al., 1997).

Equilibrio Monómero-Dímero del AcChR

Los experimentos con DTT para la obtención de monómeros de AcChR dieron el mismo resultado de invariabilidad, poniendo de manifiesto que no es necesaria la asociación de dos moléculas de AcChR para mantener el dominio. La función y estructura del AcChR tampoco dependen de la formación de dímeros (Wu y Raftery, 1981; Boheim et al., 1981), salvo en todo caso una apertura sincronizada de los mismos (Schindler et al., 1984). Este resultado significa que el dominio no se mantiene porque se encuentre de alguna manera “atrapado” entre las dos moléculas de los dímeros de AcChR presentes en las preparaciones utilizadas a lo largo de esta memoria

Tramos extramembrana del AcChR

Por último se realizó un experimento para evaluar la importancia de los tramos extramembrana sobre la estabilidad del dominio. Para ello, se sometió al AcChR a una proteólisis parcial con proteinasa K, observándose que los valores de anisotropía a baja temperatura son altos, pese a que la sigmoidicidad de la curva es casi nula. Este valor alto de la anisotropía no puede ser justificado por la presencia del AcChR, ya que en muestras con DMPC en vez de DMPA la anisotropía tiene un valor inferior. Tampoco puede ser la causa la propia composición de la vesícula ya que la anisotropía en muestras de DMPA, PC de huevo y colesterol sin AcChR es baja. De este resultado, se puede interpretar que el dominio, aunque todavía presente, pierde gran parte de su cooperatividad. Pese a que tras esta proteólisis no se consiga una eliminación total de los tramos extramembrana, si se pierden en un gran porcentaje y los que queden, muy probablemente hayan perdido su estructura original. Por tanto, las únicas estructuras de la proteína que deben de quedar prácticamente intactas serán los tramos transmembrana, por lo que han de ser los responsables fundamentales de que el dominio todavía está presente tras la proteólisis. Sin embargo, los segmentos extramembrana pudieran estabilizar la segregación de PA a través de una interacción directa con la cabeza polar del fosfolípido, por lo que su eliminación provocaría la pérdida de la cooperatividad de la transición de fase del dominio. Esta hipótesis vendría apoyada por los resultados que se obtienen con la desnaturalización del AcChR, tras lo que el dominio ve alterada su transición de fase como ya se ha discutido anteriormente. De hecho, estudios de ESR realizados con el AcChR proteolizado concluyen que las porciones extramembrana están involucradas de alguna manera en los sitios de unión a colesterol (Dreger et al., 1997), lo que solamente tendría sentido si interaccionan de alguna manera con los lípidos. Sin embargo, cabe la posibilidad de que la proteólisis de los segmentos extramembrana produzca un efecto indirecto sobre el dominio a través de la desestabilización de los tramos transmembrana, o que la eliminación incompleta de

estos segmentos de lugar a estos resultados intermedios, con sólo una desestabilización del dominio.

En cualquier caso, todos los experimentos anteriores de adición de DTT o calcio, cambio de pH, proteólisis y desnaturalización, se realizaron en condiciones en las que el dominio ya estaba formado, por lo que es difícil evaluar qué factores son responsables del origen del dominio aunque sí se pueden sacar conclusiones acerca de aquellos responsables del mantenimiento y estabilidad del dominio como ya se ha discutido. Mediante experimentos de re-reconstitución sí que se cambian las condiciones en que se forma el dominio y por lo tanto se pueden estudiar las interacciones que tienen lugar durante dicho proceso. Sin embargo, los resultados no son demasiado claros ya que el simple proceso de re-reconstitución afecta en gran manera a la formación del dominio. Por el contrario, los resultados en los que se varía las condiciones en que se realiza la primera reconstitución si que son reveladores y apuntan a que un pH de 10 o una fuerza iónica alta podrían impedir la formación del dominio, lo que apoyaría la hipótesis de que las fuerzas electrostáticas juegan un papel importante en este proceso. A este pH el AcChR está algo desnaturalizado según experimentos de FT-IR (Méthot y Baenziger, 1998), aunque según se ha comprobado por DSC, la desnaturalización no supone la eliminación del dominio. El problema de estos últimos experimentos en los que se cambian las condiciones de la reconstitución, es que se trata de condiciones muy extremas que podrían afectar al propio detergente, en este caso el colato, con lo que se añade un nuevo factor a tener en cuenta, a parte de la propia interacción del AcChR con los lípidos en los que se reconstituye.

Estudios funcionales del AcChR

Ya que el PA es parte fundamental del dominio y que es un fosfolípido que mantiene la funcionalidad del AcChR, se hizo un estudio de la actividad del receptor en muestras con y sin dominio. La función del AcChR ha sido estudiada anteriormente de manera exhaustiva, tanto en membranas nativas como reconstituido en sistemas lipídicos artificiales. Los resultados obtenidos mediante “stopped-flow” en cuanto a la actividad del AcChR en vesículas de composición compleja son similares a los ya publicados. Así, la pérdida significativa de actividad en muestras con PC como único fosfolípido presente ya había sido demostrada anteriormente con diferentes especies de PC sintético (Fong y McNamee, 1986; Ochoa et al., 1989; Sunshine y McNamee, 1992) o con PC de huevo (Fernández et al., 1993). La presencia de fosfolípidos negativos como el PG, pero sobre todo el PA restauran la actividad del AcChR, aunque en ningún caso se alcanza el nivel de actividad conseguida en matrices de lípidos de asolectina. Una posible causa es el bajo porcentaje de colesterol (25%) en estas muestras. De hecho, la reconstitución del AcChR en fosfolípidos de asolectina y colesterol al 20-25%

exhibe aproximadamente el 80% de la actividad mostrada respecto a la reconstitución en asolectina completa o en fosfolípidos de asolectina más un 40% de colesterol (Fernández-Ballester et al., 1994). También, las cadenas acílicas usadas para estos lípidos pueden no ser las más adecuadas para preservar la función del AcChR (Criado et al., 1984). A pesar de que no se consigue una actividad máxima en ningún tipo de vesículas, estas limitaciones fueron introducidas a propósito en este diseño experimental para facilitar la comparación del efecto de los diferentes grupos polares de los fosfolípidos sobre la actividad del AcChR, sin que ninguna otra variable pudiera alterar los resultados. El efecto de los diferentes fosfolípidos sobre el AcChR parece ser específico ya que, aunque se había especulado que simplemente era causado por la diferente fluidez de las matrices (Fong y McNamee, 1986), esta explicación ha sido contradicha en diferentes experimentos (Sunshine y McNamee, 1994). También en estos experimentos se pone de manifiesto que el colesterol por si mismo no es capaz de mantener la funcionalidad del AcChR, puesto que todas las muestras contienen un 25% de este lípido pero no todas presentan actividad. En trabajos más recientes se ha puesto en duda la necesidad conjunta de fosfolípidos negativos y del colesterol para mantener la función del AcChR. Así, en experimentos de "stopped-flow" se propone que el PA no es necesario, pero sí el colesterol (Rankin et al., 1997), mientras que en estudios de FT-IR de diferencia se propone que el colesterol simplemente contribuye a la fluidez de la membrana pero que el efecto específico lo realiza el PA (Baenziger et al., 2000). También se ha publicado que matrices de PC son capaces de mantener activo el AcChR (Ochoa et al., 1983; Dalziel et al., 1980), si bien por el método de preparación utilizado es probable que queden lípidos de las membranas naturales tras la reconstitución invalidando los resultados. Debe de haber diferencias en el estado funcional del AcChR, como se discute posteriormente, provocadas por el tratamiento de las muestras, o en la interpretación de los datos, para explicar estas discrepancias.

Una crítica que ha recibido este tipo de experimentos de apagamiento de fluorescencia mediante "stopped-flow" (ver apartado 18, *Análisis de la actividad del AcChR mediante técnicas de cinética rápida* en *Materiales y Métodos*), ha sido la influencia del tamaño de las vesículas empleadas en los mismos. Un volumen interior muy pequeño de las vesículas dará lugar a que el gradiente de talio entre el interior y exterior de las mismas se termine muy rápidamente, posiblemente en el tiempo muerto del aparato, obteniéndose en ese caso una actividad aparente del AcChR nula. Por ello, a todas las muestras utilizadas se les sometió a tres ciclos de congelación y descongelación, que da como resultado la obtención de vesículas de mayor tamaño y homogeneidad, favoreciendo también la distribución homogénea del AcChR (McNamee et al., 1987; Anholt et al., 1982; Ochoa et al., 1983). Con estos ciclos, muestras tan diferentes como las de DOPC, Asolectina y DOPC:PC:Col (relación molar 56:19:25),

que antes del proceso tienen vesículas con unos volúmenes internos muy diferentes: 87, 418 y 398 nl/ μ mol lípido respectivamente, pasan a tener 2445, 1826 y 1259 nl/ μ mol lípido (McNamee et al., 1987). Además la composición de las vesículas utilizadas en este estudio sólo varía en un 25%, con lo que debe de haber menos diferencias en el tamaño de las mismas. Finalmente, la coincidencia de estos resultados con los obtenidos por otros autores da más validez si cabe a estos experimentos.

Estructura secundaria del AcChR

Lo más interesante de los resultados de la influencia de la matriz lipídica sobre la actividad de la proteína, que como ya se ha dicho están ampliamente recogidos en la literatura, es su correlación con los datos de estructura secundaria obtenidos mediante FT-IR a través del análisis de la banda de amida I. La sensibilidad de la banda de amida I de la proteína al estado conformacional de la misma, permite observar que el AcChR en la matriz que contiene PA presenta prácticamente la misma estructura que en la matriz de máxima actividad, asolectina. Por otro lado, esos espectros son diferentes a los obtenidos en muestras que son inactivas desde el punto de vista funcional, como son las del AcChR en mezclas de PC de huevo y colesterol. En el caso de los fosfolípidos PG y PE, se obtienen resultados intermedios. Más concretamente, la ausencia de PA en la matriz lipídica resulta en una pérdida parcial en el componente espectral proveniente de estructura en α -hélice a 1656 cm^{-1} y en un incremento en la componente de estructura no-ordenada a 1644 cm^{-1} , así como en la de $1670\text{-}1690\text{ cm}^{-1}$, región de la amida I asignada a contribuciones de estructura en giros. Este resultado apoyaría la hipótesis de la interacción entre el dipolo que resulta de las hélices α del AcChR con los fosfatos del PA para estabilizar esta estructura (Hol et al., 1978; Sali et al., 1988). Además, hay publicados trabajos con péptidos modelo en los que también se detecta la estabilización de estructuras en α -hélice por parte de fosfolípidos aniónicos (Liu y Deber, 1997).

El efecto que los lípidos ejercen sobre la estructura del AcChR es un tema que también ha sido tratado previamente. Con la adición de PA a PC se detectó un aumento de estructura en hoja β (Butler y McNamee, 1993; Fong y McNamee, 1987), si bien estos estudios determinan un porcentaje de hoja β muy alto y uno muy bajo para hélice α respecto a otros estudios (ver más adelante en este mismo capítulo). La razón exacta para estas discrepancias no está del todo clara aunque en el caso de los experimentos por FT-IR de Fong y McNamee se realizaron en una zona del espectro de infrarrojo ($1000\text{-}900\text{ cm}^{-1}$) donde la asignación de las bandas a motivos de estructura secundaria no está bien establecida, las señales son muy débiles y las vibraciones provenientes de los lípidos podrían interferir. La composición de las vesículas también podría influir en esos resultados ya que se usan derivados diferentes del PC y PA y además, el efecto del

PA se evalúa en ausencia de colesterol. En cuanto al colesterol, parece favorecer un aumento en la estructura en α -hélice (Fernández-Ballester et al., 1994; Fong y McNamee, 1987; Butler y McNamee, 1993) y también de hoja β (Fernández-Ballester et al., 1994), por lo que se ha postulado que el anillo rígido de esterol, orientado paralelo a eje del receptor, podría situarse entre las hélices α del mismo, en la interfase lípido/proteína, estabilizándolas (Fong y McNamee, 1987). Además, se ha encontrado en estos trabajos una interdependencia entre el PA y el colesterol, de manera que las alteraciones que produce uno son dependientes de que esté presente o no el otro. De hecho, en muestras de PC, la adición de colesterol no produce ningún efecto sobre la estructura o función del AcChR (Fernández-Ballester, 1994). La desensibilización es otro proceso por el que el receptor pierde su función y por ello, también se ha estudiado los posibles cambios en estructura secundaria implicados. Los resultados son contradictorios ya que mientras en algunos trabajos se dice que hay un aumento de la estructura no ordenada (Fernández-Ballester, 1994), en otros no se ha visto cambio alguno (Butler y McNamee, 1993; Baenziger y Chew, 1997). De todos estos resultados, se podría concluir que el PA y el colesterol podrían estabilizar la estructura secundaria ordenada de la proteína, ya sea en α hélice o en hoja β . A su vez, parece que el incremento de estructura no ordenada está siempre asociada a todas las condiciones experimentales probadas en las que el AcChR no es activo, sugiriendo que la desorganización de la estructura de la proteína pudiera ser un elemento común en todos los procesos que conllevan a una pérdida reversible de la función de la misma.

Contrariamente a todos estos resultados existen una serie de trabajos realizados mediante ATR o ATR de diferencia en distintas matrices lipídicas en los que se concluye que ni la composición lipídica ni la desensibilización afectan a la estructura secundaria del AcChR. Según sus autores, la contrariedad de resultados con otros trabajos se debe a que los experimentos para la determinación de estructura secundaria por FT-IR del AcChR se realizan en D_2O en vez de H_2O , lo que lleva a errores en la estimación de dicha estructura debido a variaciones en la cinética de intercambio H-D para el AcChR reconstituido en diferentes matrices lipídicas. En estos trabajos se propone que es la diferente fluidez en las matrices lipídicas la que podría inducir una dinámica interna diferente del AcChR que daría lugar a un intercambio hidrógeno-deuterio mayor en ausencia de PA o colesterol (Baenziger et al., 1999). Este intercambio conlleva una serie de cambios en la banda de amida I como son una disminución del número de onda en el que aparecen las bandas características de la estructura secundaria. Así la banda correspondiente a no ordenada, pasa de estar a 1656 en H_2O a 1640 cm^{-1} en D_2O , aunque su intercambio es muy rápido en cualquiera de las matrices probadas (Baenziger y Méthot, 1995), por lo que su cuantificación no debería ser un problema ya que los experimentos presentados en esta memoria se realizan tras

un intercambio H-D de 3 horas, tiempo suficiente para que este proceso se haya estabilizado y finalizado (Méthot et al., 1995). Los cambios en el número de onda para las bandas de hélice α y hoja β son pequeños, por lo que no está claro en qué medida afectará el intercambio H-D a su cuantificación. Por tanto, habría que realizar un estudio cuantitativo y no cualitativo, como el que se ha realizado por ATR, de la influencia del intercambio H-D sobre la cuantificación de la estructura secundaria para estimar el error que se comete cuando se hace un estudio de este tipo para el AcChR en dos matrices lipídicas en las que el intercambio es diferente. Además, tiene más lógica interpretar los resultados obtenidos por ATR al revés: un cambio en la estructura secundaria del AcChR podría dar lugar a las diferencias de intercambio H-D en las diferentes matrices lipídicas observadas por ATR. De hecho, en esta memoria se presentan experimentos de intercambio H-D, seguido a través de la disminución de la absorbancia de la banda de amida II que apoyarían esta interpretación. Cuando el AcChR es sometido a una rampa de calentamiento, en las matrices funcionales presenta una mayor estabilidad frente al intercambio, estimada a partir de la T_m de la curva de intercambio H-D, y un mayor número de grupos que intercambian H por D, estimado a partir de la integral de la curva de intercambio H-D, que en las matrices no funcionales. Esto significa que en las primeras la proteína está más estructurada de forma que su desplegamiento está dificultado, apoyando de esta manera los datos del análisis de la estructura secundaria de la proteína, obtenidos a partir de la amida I de la misma.

Uno de los argumentos en los que se basan los experimentos de ATR para sugerir que no hay un cambio en la estructura secundaria del AcChR en diferentes matrices lipídicas, es que no encuentran diferencia alguna entre el espectro original de la amida I para el AcChR reconstituido en diferentes matrices lipídicas salvo que se haga una deconvolución del espectro, mientras que en los resultados mostrados en esta memoria sí se aprecian cambios sustanciales entre la banda de amida I original del AcChR en matrices funcionales y no funcionales. Una posible explicación a esa similitud en la amida I en los experimentos de ATR sería el que el tratamiento de las muestras diera lugar a una conformación similar aunque no idéntica del AcChR en las diferentes matrices. Por ejemplo, las muestras utilizadas en esos trabajos son sometidas a intercambios H-D de hasta tres días, lo que podría dar lugar a una desensibilización y por ello a una estructura muy parecida en todas ellas. El efecto que sobre la proteína tendría el secado de la misma, antes de la hidratación, para hacer ATR también podría contribuir al cambio conformacional del AcChR. De hecho, en esos trabajos se ha comprobado que la muestra puede desensibilizarse pero no si mantiene esa capacidad tras varias horas ni si puede traslocar iones (Baenziger et al., 1992). Este último proceso es mucho más sensible a la composición de la membrana donde se encuentra el AcChR (Criado et al., 1984), por lo que el hecho de que el AcChR sea capaz de cambiar de

afinidad no es condición suficiente para que pueda traslocar iones (Fong y McNamee, 1987; Criado et al., 1982). Además, este estudio funcional sólo se ha hecho con membranas alcalinas y no con el AcChR reconstituido en el resto de matrices lipídicas. Por otro lado, la adsorción de las muestras, que depende de su composición, a la superficie del elemento de reflexión de germanio del ATR puede afectar a las mismas y por ende al AcChR (Baenziger et al., 1992). También la orientación de las estructuras de la proteína respecto a este elemento de reflexión puede variar la intensidad de la banda correspondiente en el espectro de infrarrojo (Baenziger et al., 1992). Por último, es en cualquier caso arriesgado proponer un esquema funcional de una proteína basándose solamente en apreciaciones cualitativas de pequeñas diferencias en los espectros de infrarrojo sin que haya un estudio funcional cuantitativo detrás.

De todos los trabajos comentados sobre la estructura y función del AcChR se deduce la complejidad que rodea al sistema. Hay una gran cantidad de resultados contradictorios y la razón para ello no está del todo clara, aunque una explicación global podría ser la existencia de un esquema funcional para esta proteína realmente complejo, en el que habrían muchas más conformaciones aparte de las ya aceptadas en el esquema clásico: estado activo, reposo y desensibilizado. En ese caso, las diferentes condiciones experimentales por las que pase el receptor y la composición final de las membranas, incluyendo la cabeza polar y las cadenas acílicas, llevarían a una conformación final determinada, y por tanto a un comportamiento distinto. De hecho, el AcChR parece encontrarse en equilibrio entre diferentes conformaciones antes de que se le añada el agonista (McCarthy y Moore, 1992; Ryan et al., 2001; Baenziger et al., 2000; Raines y Krishnan, 1998), que según estudios con bloqueadores no competitivos podrían ser más que las conformaciones ya aceptadas de reposo y desensibilizado (Ryan et al., 2001), con lo que es posible que las muestras utilizadas en los diferentes estudios presenten diferentes fracciones de población en cada uno de los estados. Otros trabajos se inclinan por un modelo secuencial en el que no existe este preequilibrio, sino que simplemente hay más o menos receptores no funcionales con alta afinidad por agonista debido a la preparación de la muestra (Krauss et al., 2000; Rankin et al., 1997). Seguramente, también la sensibilidad de cada técnica para detectar las distintas conformaciones del AcChR habrá de contribuir a esta disparidad de resultados.

Pese a que no queda claro cuál es el efecto concreto de los lípidos sobre la estructura del AcChR, sí hay unanimidad en que la composición lipídica afecta a la función del receptor ya sea a través de un cambio en la estructura secundaria o a más sutiles cambios en la estructura terciaria o cuaternaria, y por una interacción directa o indirecta de los lípidos sobre la proteína. Por tanto, la presencia del dominio de PA y colesterol aseguraría el contacto de la proteína con estos lípidos o quizás unas condiciones de fluidez óptimas, permitiendo así que el AcChR mantenga la estructura

adecuada para mantenerse funcional. El perfil de presión lateral a lo largo de la región transmembrana también se ha propuesto como factor implicado en la modulación del equilibrio conformacional de péptidos y proteínas de membrana (Cantor, 1997, 1999). En estos trabajos se ha demostrado que las instauraciones, repulsiones entre las cabezas polares de los fosfolípidos o la presencia de colesterol y otras moléculas en la membrana alteran este perfil de presiones lo que podría explicar los cambios en la actividad de determinadas proteínas de membrana en presencia de ciertos lípidos u otras moléculas hidrofóbicas tales como anestésicos, etanol, etc. Se trataría por tanto de un efecto inespecífico de los lípidos, un concepto opuesto al de la interacción específica de los lípidos sobre el AcChR, pero que no se puede descartar. En este caso, el dominio podría asegurar un perfil de presiones óptimo para el funcionamiento del AcChR. Igualmente, la eliminación de este dominio podría inactivar la proteína, convirtiéndose por tanto en una diana farmacológica.

Otro dato interesante que se obtiene tras la cuantificación de los distintos motivos de estructura secundaria del AcChR, es el que se refiere a que la proteína tiene un porcentaje mayor de estructura en hélice α que en hoja β . Trabajos anteriores en los que también se ha cuantificado la estructura secundaria de esta proteína dan resultados muy contradictorios, ya que mientras algunos de ellos detectan un mayor porcentaje de hélice α , en otros es la hoja β la estructura mayoritaria. El porcentaje de α hélice supone un límite superior al número de hélices transmembrana del receptor por lo que supone un "test" para los modelos topológicos del AcChR, a falta de estudios más concluyentes mediante cristalografía de rayos X o RMN. Los primeros estudios de CD y FTIR estimaron un mayor contenido en hoja β que en hélice α (Mielke y Wallace, 1988; Fong y McNamee, 1987; Butler y McNamee, 1993). Otros estudios por CD, FT-IR y raman detectaron mayor contenido en hélice α (Wu et al., 1990; Yager et al., 1984; Castresana et al., 1992; Fernández-Ballester et al., 1994; Naumann et al., 1993). Los modelos topológicos más aceptados basados en los perfiles hidropáticos de la secuencia amonoacídica del AcChR predicen que los segmentos transmembrana son hélices α (Claudio et al., 1983; Noda et al., 1983), lo que supondría un 17%-19% de los residuos de aminoácido de la proteína, porcentaje similar al estimado por Mielke y Wallace, 1988 o Fong y McNamee, 1987 para todo el AcChR. Eso supondría que el resto del receptor estaría compuesto exclusivamente por estructuras en hoja β , giros y no ordenada, o que habría un cierto porcentaje de hoja β en la región transmembrana, como ha sido sugerido en algunos estudios (Akabas et al., 1992; Unwin, 1993; Görne-Tschelnokow et al., 1994). Sin embargo, los últimos resultados basados en ATR y CD estiman que los tramos transmembrana son básicamente α -hélices (Méthot y Baenziger, 1998; Corbin et al., 1998). Lo mismo se concluye de los experimentos con fotomarcaje (Blanton y Cohen, 1992, 1994) o por fluorescencia (Barrantes et al., 2000). Con las

estimaciones de un alto porcentaje de hélice α como se propone en esta memoria, habría suficiente para los tramos transmembrana y una porción sustancial de los extramembrana. En estudios con fragmentos solubles de la porción extramembrana N-terminal de la subunidad α del AcChR, que conservan la unión a α -bungarotoxina con afinidad similar a la subunidad entera, se ha encontrado que hay estructura en hélice α (Grant et al., 1999), lo que apoyaría los resultados aquí presentados.

Interfase lípido-proteína como diana farmacológica

La implicación del AcChR en enfermedades tales como la epilepsia, alzheimer, Parkinson, o en procesos fisiológicos como la analgesia, etc. confiere a esta proteína una dimensión farmacológica importante. La modulación de la función de este canal iónico puede ser un factor fundamental en el tratamiento de estas enfermedades. De hecho, hay una gran cantidad de productos de importancia clínica cuyo efecto sobre el AcChR está probado pero para los cuales no se conoce su sitio de acción, aunque en muchos casos se sospecha que es a través de la interfase lípido-proteína. Los anestésicos serían un ejemplo (Bigelow y Thomas, 1987; Abadji et al., 1993; Lopes y Louro, 1991; Arias et al., 1990) así como algunos esteroides (Bouzat y Barrantes, 1996; Blanton et al., 1999) y ácidos grasos (Villar et al., 1988; Vijayaraghavan et al., 1995; Andreasen y McNamee, 1980). Una posibilidad es que estos fármacos desestabilizaran el dominio de PA impidiendo la unión de este fosfolípido con el AcChR y por tanto alterando la función del receptor. En este sentido se ha propuesto un par de aminoácidos del segmento M4 del AcChR como sitio alostérico hidrofóbico ya que su mutación afecta en gran medida a la apertura del canal (Tamamizu et al., 2000). Sin embargo ninguno de los productos probados en esta memoria, entre los que se incluye el esteroide hidrocortisona y dos ácidos grasos, producen efecto alguno sobre los valores de anisotropía del *t*-PnA, que dan una idea de la fluidez del dominio, o sobre la transición de fase del PA segregado por el AcChR, datos indicativos de que el dominio no se ve alterado por la presencia de estos productos a unas concentraciones de probado efecto sobre el AcChR. Aún así, estos resultados no descartan que la interacción entre la proteína y estas sustancias no tenga lugar a través de la interfase lípido-proteína, si bien no debería ser en los mismos sitios de unión del PA con la proteína, ya que en ese caso el dominio debiera desestabilizarse. La interacción podría tener lugar en los sitios no anulares donde se situaría el colesterol como ya se ha propuesto para algunos anestésicos (Arias et al., 1990; Barrantes, 1993), ácidos grasos (Jones y McNamee, 1988; Arias, 1998) y para el agonista no competitivo quinacrina (Arias, 1997), o bien en otros sitios diferentes en la interfase lípido-proteína, sin descartar los sitios alostéricos hidrofóbicos ya comentados. La otra posibilidad es que estas sustancias se unan a sitios no polares en el interior de las proteínas de tal manera que estabilicen una conformación

inactiva para la misma (Abadji et al., 1993; Franks y Lieb, 1994; Lopez y Kosk-Kosicka, 1995). También se ha propuesto que algunas de estas sustancias ejerzan su efecto sobre el AcChR inespecíficamente, a través de la alteración de los parámetros físicos de la membrana como pudieran ser la fluidez o el orden, conectando así con la hipótesis de una fluidez óptima para la funcionalidad de la proteína (Fong y McNamee, 1986). Sin embargo los resultados obtenidos no apoyarían esta alternativa. En el caso de que estas sustancias produjeran un desorden en los lípidos del dominio el valor de la anisotropía del *t*-PnA habría descendido en su presencia, cosa que no ocurre. Este tipo de efecto sí que se ha detectado con algunos anestésicos en membranas enriquecidas en AcChR (Firestone et al., 1994), aunque no se encontró una relación directa entre el desorden en la membrana y la desensibilización del AcChR, que es el efecto que producen estas sustancias sobre la proteína.

Modelo del dominio lipídico segregado por el AcChR

Tomando conjuntamente todos los datos previamente discutidos, se propone el siguiente modelo en la interacción AcChR-membrana: el AcChR segrega un dominio lipídico, que se localiza a su alrededor y que está enriquecido en PA en forma monoaniónica, de una mezcla compleja de lípidos. Posiblemente la primera capa de lípidos está en un estado algo más fluido que el resto a cualquier temperatura debido al efecto "fluidificante" de la proteína. Estos lípidos podrían ser responsables de la endoterma a menor temperatura obtenida en DSC. En este primer anillo lipídico han de encontrarse incluidos los llamados sitios "anulares" y "no anulares" a través de los cuales los lípidos y otras sustancias hidrofóbicas modularían la función del AcChR. Alrededor de este anillo se encontrarían el resto de moléculas de PA que completarían el dominio, y que serían responsable de la endoterma más cooperativa y a más temperatura detectada por DSC. El colesterol se encontraría presente en todos estos anillos en un porcentaje cercano al 20% y es posible que también haya un pequeño porcentaje de PC de huevo. La estequiometría final será de unas 190 moléculas de PA por cada molécula de AcChR, aunque la distribución no se ha podido determinar. Sin embargo, el hecho de obtener una transición de fase cooperativa indicaría que las moléculas de AcChR deben de agregarse junto a las de PA para formar un supradominio (**figura 3**), esquema apoyado por los experimentos de FRAP donde hay una población importante de AcChR inmovilizado.

La función de este dominio estaría relacionada básicamente con la modulación directa de la actividad del AcChR a través de la estabilización de su estructura secundaria, aunque no hay que descartar su participación en otros aspectos como la localización del receptor en la membrana.

Una de las conclusiones más interesantes de todo este trabajo es la correlación entre la segregación de un dominio lipídico, la actividad del AcChR y su estructura secundaria. De hecho el PA es el fosfolípido que se segrega para formar dicho dominio y también es aquel que posibilita la conformación óptima del AcChR, y que preserva la máxima actividad de la proteína. Las características particulares de este fosfolípido, ya comentadas anteriormente en esta memoria, como son su capacidad de formar puentes de hidrógeno, el pequeño tamaño de su cabeza polar y su carga negativa, han de ser vitales para poder realizar este papel en las interacciones lípido-AcChR.

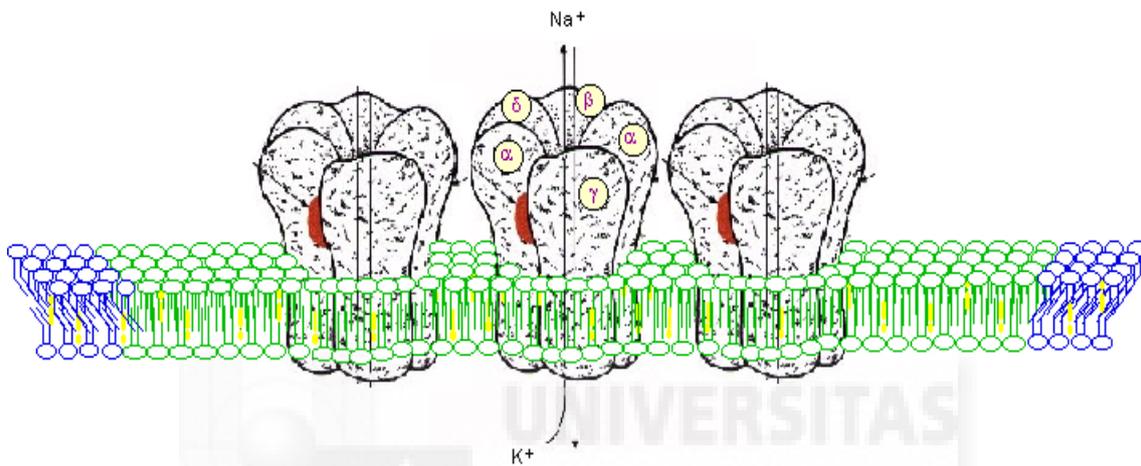


Figura 3. Modelo del dominio lipídico segregado por el AcChR. En verde se muestran los fosfolípidos que formarían el dominio, mayoritariamente PA. En azul los fosfolípidos excluidos del dominio, predominantemente PC, y en amarillo el colesterol, que se encontraría repartido homogéneamente entre todos los lípidos.

Papel fisiológico del dominio

La posibilidad de que este dominio juegue un papel regulador en la estructura y función del AcChR introduce un nuevo elemento conceptual en este campo que podría ser también relevante para otras proteínas de membrana. Por ejemplo, las observaciones sobre la selectividad por el PA del AcChR y la formación de un dominio, son similares a las obtenidas con las proteínas de envuelta del virus de estomatitis vesicular (Luan et al., 1995). A pesar de la baja concentración de PA en las membranas naturales, estas proteínas interactúan específicamente con PA y forman dominios enriquecidos en PA en las membranas de la célula huésped, lo que es esencial para la formación de nuevas partículas virales. Además, dominios enriquecidos en PA han sido propuestos como secuestradores de otros fosfolípidos aniónicos importantes biológicamente como el PIP₂ (Denisov et al., 1998) y por tanto, la formación del dominio podría configurar un sitio potencialmente importante de regulación dentro de la membrana. Para el AcChR en el órgano eléctrico de *Torpedo* también se ha encontrado un bajo porcentaje de PA en las

membranas, entre 0.5 y 1.6%, aunque es muy significativo el que conforme se enriquezcan las membranas en AcChR, aumente el porcentaje de este fosfolípido hasta un 2.2-2.9% (González-Ros et al., 1982). En cualquier caso, la interacción específica entre este fosfolípido y la proteína y la posible entrada en el dominio de otros lípidos podrían posibilitar su formación en este tejido. El PS, un fosfolípido aniónico muy enriquecido en estas membranas (González-Ros et al., 1982), a pesar de que por sí sólo no es segregado por el AcChR, sería un buen candidato a entrar en el dominio junto al PA. En el caso del virus de la estomatitis vesicular, el PS tampoco es capaz de ser segregado por las proteínas del virus salvo que haya presente PA (Luan et al., 1995). En cualquier caso, las ideas propuestas sobre las interacciones PA-AcChR mencionadas deben de tener en cuenta también la naturaleza dinámica del proceso. Estudios anteriores basados en sondas con spin postulaban que el intercambio entre fosfolípidos unidos a la proteína o libres debe ser bastante rápido (Ellena et al., 1983; East et al., 1985). Un factor importante para determinar los efectos de un fosfolípido sobre la proteína es la composición media en el tiempo de la población de fosfolípidos unidos a la proteína. En este sentido, la formación del dominio debe incrementar dramáticamente la probabilidad de exposición del AcChR a los componentes del dominio, con lo que a pesar de que el PA está presente en una pequeña proporción en las membranas, habría una interacción continua con el receptor. La inclusión del colesterol en el dominio también aseguraría un contacto constante con este lípido también fundamental para preservar la estructura y función del AcChR. Tampoco hay que descartar que la formación de este dominio ralentice el intercambio de lípidos como ocurre en los microdominios detectado en la membrana del virus de la gripe (Kawasaki et al., 2001), lo que aumentaría aún más la exposición del AcChR al PA.

El que el dominio esté formado sobretodo por PA abre también una nueva vía de regulación de la actividad del AcChR a través de la variación en la cantidad de PA presente en la bicapa lipídica mediante fosfolipasa D, que convierte a la fosfatidilcolina (PC) de la membrana celular en PA (Exton, 1990; Billah y Anthes, 1991). A su vez, la actividad de este enzima se puede regular mediante la unión de agonistas a receptores acoplados a proteínas G. Hay estudios en los que se ha demostrado que la adición de fosfolipasa D al AcChR reconstituido en vesículas de PC y colesterol, donde el receptor no presenta actividad, provoca un aumento de PA paralelo a una mayor actividad del AcChR (Bhushan y McNamee, 1993). También las células pueden sintetizar PA por la acción de la diacilglicerol quinasa sobre el diacilglicerol producido por la rotura del fosfatidilinositol mediante la fosfolipasa C. El papel funcional del PA generado endógenamente se desconoce, pero hay indicios de que pudiera interactuar con la fosfolipasa C y regular así la hidrólisis del fosfatidilinositol, mediando así

indirectamente diversas respuestas usualmente asociadas a la modulación con fosfatidilinositol (Qian y Drewes, 1991; Moolenaar et al., 1986).

Hay muchos estudios sobre la organización de dominios lipídicos en membranas biológicas y artificiales desde que se postulara su existencia (Jain y White, 1977), y hay cada vez más evidencias de su importancia biológica (Bergelson, 1995; Welti y Glaser, 1994; Raudino, 1995; Brown y London, 2000) en funciones tales como la transducción de señales (Cinek y Horejsi, 1992; Brown y London, 2000), tráfico de membrana (Brown y Rose, 1992; Simons y van Meer, 1988), fusión de membranas (Luan et al., 1995), activación de proteínas (Yang y Glaser, 1996) o “sorting” de proteínas (Simons e Ikonen, 1997). Los dominios se forman en un amplio rango de escalas de tiempo y de tamaños, desde la organización dinámica en la escala del nanometro (Mouritsen y Jorgensen, 1994; Hwang et al., 1998) a los dominios en la escala de los micrómetros, representando fracciones importantes de la superficie entera celular (Luan et al., 1995; Schütz et al., 2000). En todos los tipos de dominios detectados hasta ahora, las moléculas en su interior se intercambian con mayor o menor rapidez con las del resto de la membrana (Simons e Ikonen, 1997; Schütz et al., 2000). Sin embargo los factores que inducen esta organización no se han comprendido completamente hasta ahora. Se supone que una reorganización lateral de las membranas puede ser inducida por proteínas de membrana o péptidos. De hecho hay muchos trabajos en los que la inserción de este tipo de proteínas provoca pequeños cambios en la organización lipídica, pero sólo algunos péptidos son capaces de reorganizar una matriz lipídica, segregando un lípido particular de una mezcla compleja formando un dominio extenso y estable (Denisov et al., 1998; Wang et al., 1993; Luan et al., 1995; Haverstick et al. 1989; Yang y Glaser, 1995; Yang y Glaser, 1996; Polozov et al., 1997). Sin embargo, el trabajo que se presenta en esta memoria es de las pocas evidencias de una proteína transmembrana como el AcChR capaz de realizar algo similar, junto al efectuado con la rodopsina (Polozova y Litman, 2000). La participación activa de una proteína en la organización lipídica está opuesta a la visión de la bicapa con unas zonas de difusión bien establecidas, basada en fronteras marcadas por el citoesqueleto o en microdominios impenetrables denominados “rafts” (Simson et al., 1998). En estos modelos, interacciones puramente físicas, que incluyen interacciones de van der Waals entre cadenas largas y saturadas de esfingomielina y glicoesfingolípidos así como puentes de hidrógeno entre los grupos glicosil de glicoesfingolípidos adyacentes, promueven la formación de dominios en las membranas (Simons e Ikonen, 1997). Este tipo de dominios se ha detectado en membranas de diversas células y parecen implicar a un gran número de proteínas, que incluyen quinasas de tirosina de la familia src, proteínas unidas a GPI (Simons e Ikonen, 1997; Jacobson y Dietrich, 1999) e incluso al receptor nicotínico de acetilcolina neuronal $\alpha 7$ (Bruses et al., 2001). Este

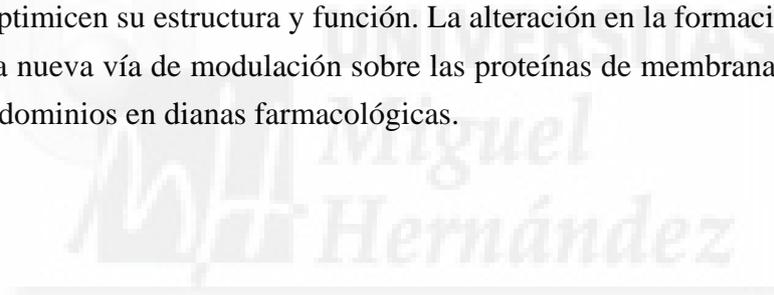
tipo de dominios se han conseguido reproducir y caracterizar en vesículas artificiales (GUVs), en monocapas o bicapas planas y en extractos lipídicos de membranas naturales (Dietrich et al., 2001). En estas vesículas se observan dos fases fluidas, simétricas en cuanto a las dos hemicapas, aunque una de ellas algo más ordenada (“raft”), sobre todo en la parte de las cadenas acílicas. En ausencia de colesterol también se formarían dos fases aunque la que forma los “rafts” estaría en fase gel. Este tipo de dominio también se ha visto y caracterizado en cuanto a forma, difusión y tamaño mediante microscopía de molécula única (Schütz et al., 2000). La capacidad de los dominios o “rafts” de segregar proteínas cuando se incorporan a la membrana está atribuido también a las diferencias en el entorno físico dentro de los dominios lipídicos comparados con otras regiones de la membrana (Schroeder et al., 1994; Simons e Ikonen, 1997), siendo una región fundamental la interfase lípido-agua (Dietrich et al., 2001). En este esquema, las proteínas permanecen confinadas en los dominios hacia los cuales han sido dirigidos, pero no participan en la formación o mantenimiento de los mismos, excepto a través de su unión al citoesqueleto. Otras veces, la segregación de una proteína hacia esos dominios se realiza indirectamente, a través de la interacción con otra proteína que sí es segregada por los “rafts” (Oliferenko et al., 1999). Sin embargo, este no es el caso referido en esta memoria, ya que las vesículas de AcChR reconstituido, no contienen elementos del citoesqueleto, y el dominio lipídico sólo es detectado cuando la proteína está presente. En cualquier caso, el modelo de “clustering” propuesto por Simons y cols. podría ser aplicado a este sistema. En él se sugiere que los “rafts” existirían inicialmente aunque de pequeño tamaño y dispersos en las membranas, pero podría ser inducida la formación de parches mediante el “clustering” de componentes de membrana que darían lugar a grandes dominios. El AcChR podría interaccionar de este modo con PA para formar dominios de este fosfolípido segregados del resto de los componentes de la vesícula. En este posible esquema no hay que descartar que la formación del dominio esté de alguna manera implicada en el “clustering” de algún subtipo de AcChR, aunque en el caso de la unión neuromuscular este proceso parece basado solamente en la interacción con la proteína citoplasmática 43K (Gautam et al., 1995,1996; Sanes y Lichtman, 1999).

CONCLUSIONES



- 1) El receptor nicotínico de acetilcolina es capaz de segregar un dominio lipídico en vesículas de composición lipídica compleja. Este proceso ha sido detectado por tres técnicas diferentes como son: espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, calorimetría diferencial de barrido y anisotropía de fluorescencia.
- 2) El dominio segregado por el AcChR en vesículas de DMPA, PC de huevo y colesterol está compuesto mayoritariamente por el fosfolípido aniónico DMPA y en menor medida por colesterol, dos lípidos por el que el AcChR tiene alta afinidad.
- 3) El PA segregado por el AcChR tiene unas características físico-químicas alteradas respecto al PA puro, como son: menor temperatura de transición, menor afinidad por el calcio, deshidratación en su parte polar, mayor desorden en sus cadenas acílicas, y mayor valor de pK_a para el grupo fosfato, lo que favorece la forma monoaniónica del mismo frente a la dianiónica. Esto confirma la íntima interacción entre este lípido y la proteína.
- 4) El dominio de PA segregado por el AcChR se encuentra a su alrededor y tendría una estequiometría de 190 moléculas de PA por cada una de proteína, lo que equivaldría a aproximadamente 4 capas de este fosfolípido, suponiendo un dominio simétrico entre las dos hemicapas de la membrana. Por tanto, el dominio no se corresponde con el llamado “ánulo” lipídico, sino que es una estructura mucho mayor.
- 5) Las fuerzas que originan la formación del dominio posiblemente implican interacciones electrostáticas entre aminoácidos con carga positiva en los extremos de los segmentos M4 de las distintas subunidades del AcChR y los grupos fosfato con carga negativa del PA. Sin embargo debe de haber además interacciones de otra naturaleza para explicar completamente cómo tiene lugar la segregación del PA por parte del AcChR. En cualquier caso es la región transmembrana de la proteína la responsable fundamental de la formación del dominio.

- 6) La estructura y función del AcChR dependen de la composición lipídica de las vesículas en que se reconstituye, siendo la presencia de lípidos aniónicos fundamental para mantener una estructura y función óptimas.
- 7) Existe una correlación entre la segregación de PA por parte del AcChR y el mantenimiento de una actividad y función óptimas de esta proteína. Es decir, la formación del dominio de PA serviría a la proteína para asegurarse un contacto continuo con este tipo de fosfolípido y por tanto mantener una estructura y función óptimas.
- 8) Los resultados obtenidos en esta memoria descubren nuevos aspectos de la dinámica de las membranas celulares y más en concreto en la formación de dominios en las mismas. Las proteínas de membranas serían capaces de alterar la organización lateral de las membranas a fin de rodearse de aquellos lípidos que optimicen su estructura y función. La alteración en la formación del dominio es una nueva vía de modulación sobre las proteínas de membrana y convierte a estos dominios en dianas farmacológicas.



BIBLIOGRAFÍA



- Abadji V.C., Raines D.E., Watts A., Miller K.W.** (1993). The effect of general anaesthetics on the dynamics of phosphatidylcholine-acetylcholine receptor interactions in reconstituted vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1147: 143-53.
- Adams, P.R.** (1981). Acetylcholine receptor kinetics. *J. Memb. Biol.* 58: 161-174.
- Addona G.H., Sandermann H. Jr., Kloczewiak M.A., Husain S.S., Miller K.W.** (1998). Where does cholesterol act during activation of the nicotinic acetylcholine receptor? *Biochim Biophys Acta* 1370: 299-309.
- Akabas M.H., Kaufmann C., Archdeacon P., Karlin A.** (1994). Identification of acetylcholine receptor channel-lining residues in the entire M2 segment of the alpha subunit. *Neuron* 13: 919-27.
- Akabas M.H., Stauffer D.A., Xu M, Karlin A.** (1992). Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine-substitution mutants. *Science* 258: 307-10.
- Andreasen, T.J. y McNamee, M.G.** (1977). Phospholipase A inhibition of acetylcholine receptor function in *Torpedo californica* membrane vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 79: 958-965.
- Andreasen, T.J. y McNamee, M.G.** (1980). Inhibition of ion permeability control properties of acetylcholine receptor from *Torpedo californica* by long-chain fatty acids. *Biochemistry* 19: 4719-4726.
- Anholt R., Fredkin D.R., Deerinck T., Ellisman M., Montal M., Lindstrom J.** (1982). Incorporation of acetylcholine receptors into liposomes. Vesicle structure and acetylcholine receptor function. *J Biol Chem.*257: 7122-34.
- Antollini S.S., Barrantes F.J.** (1998). Disclosure of discrete sites for phospholipid and sterols at the protein-lipid interface in native acetylcholine receptor-rich membrane. *Biochemistry* 37: 16653-62.
- Antollini S.S., Soto M.A., Bonini de Romanelli I., Gutierrez-Merino C., Sotomayor P., Barrantes F.J.** (1996). Physical state of bulk and protein-associated lipid in nicotinic acetylcholine receptor-rich membrane studied by laurdan generalized polarization and fluorescence energy transfer. *Biophys J.* 70: 1275-84.
- Arias H.R., Sankaram M.B., Marsh D., Barrantes F.J.** (1990). Effect of local anaesthetics on steroid-nicotinic acetylcholine receptor interactions in native membranes of *Torpedo marmorata* electric organ. *Biochim Biophys Acta* 1027: 287-94.
- Arias H.R.** (1996). Luminal and non-luminal non-competitive inhibitor binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor. *Mol Membr Biol.* 13: 1-17.
- Arias H.R.** (1997). The high-affinity quinacrine binding site is located at a non-annular lipid domain of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochim Biophys Acta* 1347: 9-22.
- Arias H.R.** (1998). Binding sites for exogenous and endogenous non-competitive inhibitors of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochim Biophys Acta* 1376: 173-220.
- Arrondo, J.L., Muga A., Castresana J. y Goñi F.M.** (1993). Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Prog.Biophys.Mol.Biol.* 59:23-56.
- Artigues, A., Villar, M.T., Fernández, A.M., Ferragut, J.A. y González-Ros, J.M.** (1989). Cholesterol stabilizes the structure of the nicotinic acetylcholine receptor reconstituted in lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 985: 325-330.

- Baenziger J.E., Darsaut T.E., Morris M.L.** (1999). Internal dynamics of the nicotinic acetylcholine receptor in reconstituted membranes. *Biochemistry* 38: 4 905-11.
- Baenziger J.E., Miller K.W., Rothschild K.J.** (1992). Incorporation of the nicotinic acetylcholine receptor into planar multilamellar films: characterization by fluorescence and Fourier transform infrared difference spectroscopy. *Biophys J.* 61: 983-92.
- Baenziger J.E., Miller K.W., Rothschild K.J.** (1993). Fourier transform infrared difference spectroscopy of the nicotinic acetylcholine receptor: evidence for specific protein structural changes upon desensitization. *Biochemistry* 32: 5448-54.
- Baenziger J.E., Morris M.L., Darsaut T.E., Ryan S.E.** (2000). Effect of membrane lipid composition on the conformational equilibria of the nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem.* 275: 777-84.
- Baenziger J.E. y Chew J.P.** (1997). Desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor mainly involves a structural change in solvent-accessible regions of the polypeptide backbone. *Biochemistry* 36: 3617-3624.
- Baenziger J.E. y Méthot N.** (1995). Fourier Transform infrared and hydrogen/deuterium exchange reveal an exchange-resistant core of α -helical peptide hydrogens in the nicotinic acetylcholine receptor. *J.Biol.Chem.* 270: 29129-29137.
- Bagatolli L.A., Gratton E.** (2000). Two photon fluorescence microscopy of coexisting lipid domains in giant unilamellar vesicles of binary phospholipid mixtures. *Biophys J.* 78: 290-305.
- Bañuelos S., Arrondo J.L., Goñi F.M. y Pifat G.** (1995). Surface-core relationships in human low density lipoprotein as studied by infrared spectroscopy. *J.Biol.Chem.* 270:9192-9196.
- Barrantes F.J.** (1998). The nicotinic acetylcholine receptor. Current views and future trends. (ed. F.J. Barrantes). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg y R.G. Landes Company, Georgetown, TX, U.S.A.
- Barrantes F.J., Antollini S.S., Blanton M.P., Prieto M.** (2000). Topography of nicotinic acetylcholine receptor membrane-embedded domains. *J Biol Chem.* 275: 37333-9.
- Barrantes F.J.** (1993). Structural-functional correlates of the nicotinic acetylcholine receptor and its lipid microenvironment. *FASEB J.* 7: 1460-7.
- Bazzi M.D., Nelsestuen G.L.** (1991). Extensive segregation of acidic phospholipids in membranes induced by protein kinase C and related proteins. *Biochemistry* 30: 7961-9.
- Beck, A., Heissler, D., Duportail, G.** (1990). 1-palmitoyl-2-[3-(diphenylhexatrienyl) propanoyl]-sn-glycero-3-phosphoethanolamine as a fluorescent membrane probe. Synthesis and partitioning properties. *Chem. and Phys. of lipids* 55: 13-24.
- Ben-Yashar V., Barenholz Y.** (1989). The interaction of cholesterol and cholest-4-en-3-one with dipalmitoylphosphatidylcholine. Comparison based on the use of three fluorophores. *Biochim Biophys Acta* 985: 271-8.
- Bergelson L.D.** (1995). Dynamic lipid heterogeneity and receptor events. *Mol Membr Biol.* 12: 125-9.
- Bhushan A. y McNamee M.G.** (1993). Correlation of phospholipid structure with functional effects on the nicotinic acetylcholine receptor. A modulatory role for phosphatidic acid. *Biophys.J.* 64: 716-723.

- Bhushan A. y McNamee, M.G.** (1990). Differential scanning calorimetry and Fourier transform infrared analysis of lipid-protein interactions involving the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochim. Biophys. Acta* 1027: 93-101.
- Bigelow D.J., Thomas D.D.** (1987). Rotational dynamics of lipid and the Ca-ATPase in sarcoplasmic reticulum. The molecular basis of activation by diethyl ether. *J Biol Chem.* 262: 13449-56.
- Billah M.M., y Antes J.C.** (1991). The regulation and cellular functions of phosphatidylcholine hydrolysis. *Biochem. J.* 269: 173-183.
- Blanton M.P., Cohen J.B.** (1994). Identifying the lipid-protein interface of the *Torpedo* nicotinic acetylcholine receptor: secondary structure implications. *Biochemistry* 33: 2859-72.
- Blanton M.P., Dangott L.J., Raja S.K., Lala A.K., Cohen J.B.** (1998). Probing the structure of the nicotinic acetylcholine receptor ion channel with the uncharged photoactivable compound -3H-diazofluorene. *J Biol Chem.* 273: 8659-68.
- Blanton M.P., McCurdy E.A., Huggins A., Parikh D.** (1998). Probing the structure of the nicotinic acetylcholine receptor with the hydrophobic photoreactive probes [125I]TID-BE and [125I]TIDPC/16. *Biochemistry* 37: 14545-55.
- Blanton M.P., Wang H.H.** (1991). Localization of regions of the *Torpedo californica* nicotinic acetylcholine receptor labelled with an aryl azide derivative of phosphatidylserine. *Biochim Biophys Acta* 1067: 1-8.
- Blanton M.P., Xie Y, Dangott L.J., Cohen J.B.** (1999). The steroid promegestone is a noncompetitive antagonist of the *Torpedo* nicotinic acetylcholine receptor that interacts with the lipid-protein interface. *Mol Pharmacol.* 55: 269-78.
- Blanton M.P., y Wang H.H.** (1990). Photoaffinity labelling of the *Torpedo californica* nicotinic acetylcholine receptor with an aryl azide derivative of phosphatidylserine. *Biochemistry* 29: 1186-1194.
- Blanton M.P. y Cohen J.B.** (1992). Mapping the lipid-exposed regions in the *Torpedo californica* nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* 31:3738-3750.
- Blount P., Merlie J.P.** (1989). Molecular basis of the two nonequivalent ligand binding sites of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* 3: 349-57.
- Blume A., Hillmann M.** (1986). Dimyristoylphosphatidic acid/cholesterol bilayers. Thermodynamic properties and kinetics of the phase transition as studied by the pressure jump relaxation technique. *Eur Biophys J.* 13: 343-53.
- Blume A.** (1980). Thermotropic behaviour of phosphatidylethanolamine-cholesterol and phosphatidylethanolamine-phosphatidylcholine-cholesterol mixtures. *Biochemistry* 19: 4908-13.
- Blume A.** (1983). Apparent molar heat capacities of phospholipids in aqueous dispersion. Effects of chain length and head group structure. *Biochemistry* 22: 5436-5442.
- Blume A.** (1988). Applications of calorimetry to lipid model membranes. En *Physical Properties of Biological Membranes and Their Functional Implications.* (ed. C. Hidalgo) pp 71-121. Plenum Press/N.Y.
- Blume A., Hubner W., Messner G.** (1988). Fourier transform infrared spectroscopy of ¹³C = O-labelled phospholipids hydrogen bonding to carbonyl groups. *Biochemistry* 27: 8239-49.

- Boheim G., Hanke W., Barrantes F.J., Eibl H., Sakmann B., Fels G., Maelicke A.** (1981). Agonist-activated ionic channels in acetylcholine receptor reconstituted into planar lipid bilayers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 78: 3586-90.
- Bötcher C. S. F., Van Gent C. M. y Freis, C.** (1961). A rapid sensitive submicro phosphorus determination. *Anal. Chim. Acta* 24: 203-204.
- Bouzat C., Barrantes F.J.** (1996). Modulation of muscle nicotinic acetylcholine receptors by the glucocorticoid hydrocortisone. Possible allosteric mechanism of channel blockade. *J Biol Chem*. 271: 25835-41.
- Brisson A. y Unwin P.N.T.** (1985). Quaternary structure of the acetylcholine receptor. *Nature* 315: 474-477.
- Browning J.L. y Nelson D.L.** (1976). Amphipathic amines affect membrane excitability in Paramecium: Role of the bilayer couple. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*. 73: 452-456.
- Brown D.A., London E.** (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem*. 275: 17221-4.
- Brown D.A., Rose J.K.** (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68: 533-44.
- Bruses J., Chauvet N., Rutishauser U.** (2001). Membrane lipid rafts are necessary for the maintenance of the (alpha)7 nicotinic acetylcholine receptor in somatic spines of ciliary neurons. *J Neurosci*. 21: 504-12.
- Burden S.J., DePalma R.L. y Gottesman G.S.** (1983). Crosslinking of proteins in acetylcholine receptor-rich membranes: Association between the β -Subunit and the 43 Kd subsynaptic protein. *Cell* 35: 687-692.
- Butler D.H., McNamee M.G.** (1993). FTIR analysis of nicotinic acetylcholine receptor secondary structure in reconstituted membranes. *Biochim Biophys Acta* 1150: 17-24.
- Calhoun W.I., Shipley G.G.** (1979). Sphingomyelin--lecithin bilayers and their interaction with cholesterol. *Biochemistry* 18: 1717-22.
- Cameron D.G. y Moffatt D.J.** (1984). Deconvolution, Derivation, and Smoothing of Spectra Using Fourier Transforms. *J. Test Eval.* 12: 78-85.
- Campos-Caro A., Rovira J.C., Vicente-Agullo F., Ballesta J.J. Sala S., Criado M., Sala F.**(1997). Role of the putative transmembrane segment M3 in gating of neuronal nicotinic receptors. *Biochemistry* 36: 2709-15.
- Cantor R.S.** (1999). Lipid composition and the lateral pressure profile in bilayers. *Biophys J*. 76: 2625-39.
- Cantor R.S.** (1997). Lateral pressures in cell membranes: a mechanism for modulation of protein function. *J.Phys.Chem.* 101:1323-1325.
- Carsten F., Keilhack H., Opitz F., Zschörnig O., Böhmer F.D.** (1999). Binding of phosphatidic acid to the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 as a basis for activity modulation. *Biochemistry* 38: 11993-12002.

- Casal H.L. y Mantsch H.H.** (1984). Polymorphic phase behaviour of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy. *Biochim.Biophys.Acta* 779:381-401.
- Castresana J., Fernández-Ballester G., Fernandez A.M., Laynez J.L., Arrondo J.L., Ferragut J.A., y González-Ros J.M.** (1992). Protein structural effects of agonist binding to the nicotinic acetylcholine receptor. *FEBS Lett.* 314: 171-175.
- Castuma C.E., Brenner R.R., DeLuca-Gattas E.A., Schreier S., Lamy-Freund M.T.** (1991). Cholesterol modulation of lipid-protein interactions in liver microsomal membrane: a spin label study. *Biochemistry* 30: 9492-7.
- Cezanne L., Lopez A., Loste F., Parnaud G., Saurel O., Demange P., Tocanne J.F.** (1999). Organization and dynamics of the proteolipid complexes formed by annexin V and lipids in planar supported lipid bilayers. *Biochemistry* 38: 2779-86
- Changeux J.P.** (1990). The nicotinic acetylcholine receptor: an allosteric protein prototype of ligand-gated ion channels. *TIPS* 11: 485-492.
- Changeux J.P., Devillers-Thiéry A. y Chemouilli P.** (1984). Acetylcholine receptor: an allosteric protein. *Science* 225: 1335-1345.
- Chatrenet B., Tremeau O., Bontems F., Goeldner M.P., Hirth C.G., Menez A.** (1990). Topography of toxin-acetylcholine receptor complexes by using photoactivatable toxin derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 3378-82.
- Chattopadhyay A., McNamee M.G.** (1991). Average membrane penetration depth of tryptophan residues of the nicotinic acetylcholine receptor by the parallax method. *Biochemistry* 30: 7159-64.
- Chattopadhyay A. y London, E.** (1987). Parallax method for direct measurement of membrane penetration depth utilizing fluorescence quenching by spin-labeled phospholipids. *Biochemistry* 26: 39-45.
- Cinek T., Horejsi V.** (1992). The nature of large noncovalent complexes containing glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane glycoproteins and protein tyrosine kinases. *J Immunol.* 149: 2262-70.
- Claudio T., Ballivet M., Patrick J., Heinemann S.** (1983). Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Torpedo californica* acetylcholine receptor gamma subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80: 1111-5.
- Comfurius P., Zwaal R.F.** (1977). The enzymatic synthesis of phosphatidylserine and purification by CM-cellulose column chromatography. *Biochim Biophys Acta* 488:36-42.
- Conti-Tronconi B.M. y Raftery M.A.** (1982). The nicotinic cholinergic receptor: Correlation of molecular structure with functional properties. *Ann. Rev. Biochem.* 51: 491-530.
- Conti-Tronconi B.M., Hunkapiller M.W., Lindstrom J. y Raftery M.A.** (1982). Subunit Structure of the Acetylcholine Receptor from *Electrophorus electricus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.* 79: 6489-6493.
- Cooper J.R. y Meyer E.M.** (1984). Possible mechanism involved in the release and modulation of the release of neuroactive agents. *Neurochem. Int.* 6: 833-846.
- Corbin J., Methot N., Wang H.H., Baenziger J.E., Blanton M.P.** (1998). Secondary structure analysis of individual transmembrane segments of the nicotinic acetylcholine receptor by circular dichroism and Fourier transform infrared spectroscopy. *J Biol Chem.* 273: 771-7.

Coutinho A. y Prieto M. (1993). Ribonuclease T1 and Alcohol Dehydrogenase fluorescence quenching by acrylamide. A laboratory experiment for undergraduate students. *J. Chem. Ed.* 70: 425.

Criado M., Eibl H. y Barrantes F.J. (1982). Effects of lipids on acetylcholine receptor. Essential need of cholesterol for maintenance of agonist-induced state transitions in lipid vesicles. *Biochemistry* 21: 3622-3629.

Criado M., Vaz W.L.C., Barrantes F.J. y Jovin T.M. (1982). Translational diffusion of acetylcholine receptor (monomeric and dimeric forms) of *Torpedo marmorata* reconstituted into phospholipid bilayers studied by fluorescence recovery after photobleaching. *Biochemistry* 21: 5750-5755.

Criado M., Eibl H., y Barrantes F.J. (1984). Functional properties of the acetylcholine receptor incorporated in model lipid membranes. Differential effects of chain length and head group of phospholipids on receptor affinity states and receptor-mediated ion translocation. *J. Biol. Chem.* 259: 9188-9198.

Criado M., Sarin V., Fox J.L. y Lindstrom J. (1985). Structural localization of the sequence α 235-242 of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128: 864-871.

Czajkowski C., Karlin A. (1995). Structure of the nicotinic receptor acetylcholine-binding site. Identification of acidic residues in the delta subunit within 0.9 nm of the 5 alpha subunit-binding. *J. Biol. Chem.* 270: 3160-4.

Dalziel A.W., Rollins E.S., McNamee M.G. (1980). The effect of cholesterol on agonist-induced flux in reconstituted acetylcholine receptor vesicles. *FEBS Lett.* 122: 193-6.

de Kruijff B. (1997). Biomembranes. Lipids beyond the bilayer. *Nature* 386: 129-130.

de Planque M.R., Kruijtz J.A., Liskamp R.M., Marsh D., Greathouse D.V., Koeppe R.E. 2nd, de Kruijff B., Killian J.A. (1999). Different membrane anchoring positions of tryptophan and lysine in synthetic transmembrane alpha-helical peptides. *J Biol Chem.* 274: 20839-46.

Denisov G., Wanaski S., Luan P., Glaser M. y McLaughlin S. (1998). Binding of basic peptides to membranes produces lateral domains enriched in the acidic lipids phosphatidylserine and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: an electrostatic model and experimental results. *Biophys.J.* 74: 731-744.

deNoyer L.K. y Dodd J.G. (1990). Maximum likelihood smoothing of noisy data. *Am. Lab.* 3: 21-27.

Dergunov A.D., Taveirne J., Vanloo B., Caster H., Rosseneu M. (1997). Structural organization of lipid phase and protein-lipid interface in apolipoprotein-phospholipid recombinants: influence of cholesterol. *Biochim Biophys Acta* 1346: 131-46.

Désormeaux A., Laroche G., Bougis P.E., Pezolet M. (1992). Characterization by infrared spectroscopy of the interaction of a cardiotoxin with phosphatidic acid and with binary mixtures of phosphatidic acid and phosphatidylcholine. *Biochemistry* 31: 12173-82.

Devillers-Thiéry A., Giraudat J., Bentaboulet M. y Changeux J.P. (1983). Complete mRNA coding sequence of the acetylcholine binding α -subunit of *Torpedo marmorata* acetylcholine receptor: A model for the transmembrane organization of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 2067-2071.

Dietrich C., Bagatolli L.A., Volovyk Z.N., Thompson N.L., Levi M., Jacobson K., Gratton E. (2001). Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys J.* 80: 1417-28.

- Donelly-Roberts D.L., Mihovilovic M., González-Ros J.M., Richman D. y Martínez-Carrión M.** (1984). A noncholinergic site-directed monoclonal antibody can impair agonist-induced ion flux in *Torpedo californica* acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 7999-8003.
- Dreger M., Krauss M., Herrmann A., y Hucho F.** (1997). Interactions of the nicotinic acetylcholine receptor transmembrane segments with the lipid bilayer in native receptor- rich membranes. *Biochemistry* 36: 839-847.
- Dufourc E.J., Parish E.J., Chitrakorn S. y Smith, I.C.P.** (1984). Structural and dynamical details of cholesterol-lipid interactions as revealed by deuterium NMR. *Biochemistry* 23: 6062-6071.
- Dunant Y. e Israel M.** (1985). The Release of Acetylcholine. *Scientific American* 252: 58-66.
- East J.M., Melville D., y Lee A.G.** (1985). Exchange rates and numbers of annular lipids for the calcium and magnesium ion dependent adenosinetriphosphatase. *Biochemistry* 24: 2615-2623.
- Eastman S.J., Wilschut J., Cullis P.R., Hope M.J.** (1991). Transbilayer transport of phosphatidic acid in response to transmembrane pH gradients. *Biochemistry* 30: 1740-1745.
- Echabe I., Encinar J.A., y Arrondo J.L.** (1997). Removal of spectral noise in the quantitation of protein structure through infrared band decomposition. *Biospectroscopy* 3: 469-475.
- Eibl H., Blume A.** (1979). The influence of charge on phosphatidic acid bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta* 553: 476-88.
- Ellena J.F., Blazing M.A., y McNamee M.G.** (1983). Lipid-protein interactions in reconstituted membranes containing acetylcholine receptor. *Biochemistry* 22: 5523-5535.
- Epstein M. y Racker E.** (1978). Recostitution of carbamylcholine-dependent sodium ion flux and desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *J. Biol. Chem.* 253: 6660-6662.
- Esmann M. y Marsh D.** (1985). Spin-label studies on the origin of the specificity of lipid- protein interactions in (Na⁺,K⁺)-ATPase membranes from *Squalus acanthias*. *Biochemistry* 24:3572-3578.
- Esmann M., Watts A., y Marsh D.** (1985). Spin-label studies of lipid-protein interactions in (Na⁺,K⁺)-ATPase membranes from rectal glands of *Squalus acanthias*. *Biochemistry* 24:1386-1393.
- Estep T.N., Mouncastle D.B., Biltonen R.L. y Thompson T.E.** (1978). Studies on the anomalous thermotropic behaviour of aqueous dispersions of DPPC-cholesterol mixtures. *Biochemistry* 17: 1984-1989.
- Exton J.H.** (1990). Signalling through phosphatidylcholine breakdown. *J. Biol. Chem* 265: 1-4.
- Fairclough R.H., Finer-Moore J., Love R.A., Kristofferson D., Desmeules P.J. y Stroud R.M.** (1983). Subunit organization and structure of an acetylcholine receptor. Molecular Neurobiology. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 48: 9-20.
- Fernández A.M., Fernández-Ballester G., Ferragut J.A. y González-Ros J.M.** (1993). Labeling of the nicotinic acetylcholine receptor by a photoactivatable steroid probe: effects of cholesterol and cholinergic ligands. *Biochim.Biophys.Acta* 1149:135-144.
- Fernández-Ballester G., Castresana J., Fernández A.M., Arrondo J.L., Ferragut J.A., y González-Ros J.M.** (1994). Role of cholesterol as a structural and functional effector of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochem.Soc.Trans.* 22:776-780.

- Ferragut J.A., González-Ros J.M., Peterson D.L., Weir D.L., Franson R.C. y Martínez-Carrión M.** (1984). Rapid purification of a phospholipase-free α -Bungarotoxin: maintenance of cation barriers of acetylcholine receptor membranes upon preincubation with purified toxin. *Arch. Biochem. Biophys.* 235: 628-635.
- Finer-Moore J. y Stroud R.M.** (1984). Amphipathic analysis and possible formation of the ion channel in an acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 155-159.
- Firestone L.L., Alifimoff J.K., Miller K.W.** (1994). Does general anaesthetic-induced desensitization of the *Torpedo* acetylcholine receptor correlate with lipid disordering? *Mol Pharmacol.* 46: 508-15.
- Fong T.M. y McNamee M.G.** (1986). Correlation between acetylcholine receptor function and structural properties of membranes. *Biochemistry* 25:830-840.
- Fong T.M. y McNamee M.G.** (1987). Stabilization of acetylcholine receptor secondary structure by cholesterol and negatively charged phospholipids in membranes. *Biochemistry* 26:3871-3880.
- Förster T.** (1959). Experimentelle und theoretische untersuchung des zwischenmolekularen übergangs von electronenanregungsenergie. *A. Naturforsch. A. Astrophys. Phys. Chem.* 4: 321.
- Franks N.P., Lieb W.R.** (1994). Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 367: 607-14.
- Galzi J.L., Bertrand D., Devillers-Thiéry A., Revah F., Bertrand S. y Changeux J.P.** (1991). Functional significance of aromatic amino acid from three peptide loops of the $\alpha 7$ neuronal nicotinic receptor site investigated by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett.* 294: 198-212.
- Garidel P., Johann C., Blume A.** (1997). Nonideal mixing and phase separation in phosphatidylcholine-phosphatidic acid mixtures as a function of acyl chain length and pH. *Biophys J.* 72: 2196-210.
- Gautam M., Noakes P.G., Moscoso L., Rupp F., Scheller R.H., Merlie J.P., Sanes J.R.** (1996). Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell* 85: 525-35.
- Gautam M., Noakes P.G., Mudd J., Nichol M., Chu G.C., Sanes J.R., Merlie J.P.** (1995). Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature* 377: 232-6.
- Gavel Y., von Heijne G.** (1992). The distribution of charged amino acids in mitochondrial inner-membrane proteins suggests different modes of membrane integration for nuclearly and mitochondrially encoded proteins. *Eur J Biochem.* 205: 1207-15.
- Gennis R.B.** (1989). Biomembranes. Molecular structure and function. (ed. C.R. Cantor). Springer-Verlag, NY.
- González-Ros J.M., Farach M.C. y Martínez-Carrión M.** (1983). Ligand-induced effects at regions of acetylcholine receptor accessible to membrane lipids. *Biochemistry* 22: 3807-3811.
- González-Ros J.M., Ferragut J.A., y Martínez-Carrión M.** (1984). Binding of anti-acetylcholine receptor antibodies inhibits the acetylcholine receptor mediated cation flux. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120: 368-375.
- González-Ros J.M., Paraschos A., Farach M.C. y Martínez-Carrión M.** (1981). Characterization of acetylcholine receptor isolated from *Torpedo californica* electroplax through the use of an easily removable detergent, β -D-octylglucopyranoside. *Biochim. Biophys. Act.* 643: 407-420.

- González-Ros J.M., Paraschos A., Llanillo M. y Martínez-Carrión M.** (1982). Environment of acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *Biochemistry* 21: 3467-3474.
- Görne-Tschelnokow U., Strecker A., Kaduk C., Naumann D., Hucho F.** (1994). The transmembrane domains of the nicotinic acetylcholine receptor contain alpha-helical and beta structures. *EMBO J.* 13: 338-41.
- Graham I., Gagne J., Silvius J.R.** (1985). Kinetics and thermodynamics of calcium-induced lateral phase separations in phosphatidic acid containing bilayers. *Biochemistry* 24: 7123-31.
- Graham J.M., Wallach D.F.** (1971). Protein conformational transitions in the erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta* 241: 180-94.
- Grant M.A., Gentile L.N., Shi Q-L., Pellegrini M. y Hawrot E.** (1999). Expression and spectroscopic analysis of soluble nicotinic acetylcholine receptor fragments derived from the extracellular domain of the α -subunit. *Biochemistry* 38: 10730-10742.
- Gregory R.B. y Rosenberg, A.** (1986). Protein conformational dynamics measured by hydrogen isotope exchange techniques. *Methods Enzymol.* 131: 448-508.
- Griffith O.H., Brothorus J.R. y Jost P.C.** (1982). Lipid Protein Interactions. Jost, P.C. y Griffith, O.H. (Eds.) vol 2 pp 225-238. Wiley y Sons Ltd, New York.
- Griffiths P.R. y De Haseth J.A.** (1986). Fourier transform infrared spectroscopy. *Chem. Anal. Ser. Monogr. Anal. Chem. Appl.* 83.
- Gutierrez-Merino C., Bonini de Romanelli I.C., Pietrasanta L.I., Barrantes F.J.** (1995). Preferential distribution of the fluorescent phospholipid probes NBD-phosphatidylcholine and rhodamine-phosphatidylethanolamine in the exofacial leaflet of acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata*. *Biochemistry* 34: 4846-55.
- Gutierrez-Merino C., Centeno F., Garcia-Martin E., Merino J.M.** (1994). Fluorescence energy transfer as a tool to locate functional sites in membrane proteins. *Biochem Soc Trans.* 22: 784-8.
- Gutierrez-Merino C., Munkonge F., Mata A.M., East J.M., Levinson B.L., Napier R.M., Lee A.G.** (1987). The position of the ATP binding site on the $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ -ATPase. *Biochim Biophys Acta* 897: 207-16.
- Gutierrez-Merino C.** (1981). Quantitation of the Forster energy transfer for two-dimensional systems. I. Lateral phase separation in unilamellar vesicles formed by binary phospholipid mixtures. *Biophys Chem.* 14: 247-57.
- Gutierrez-Merino C.** (1981). Quantitation of the Forster energy transfer for two-dimensional systems. II. Protein distribution and aggregation state in biological membranes. *Biophys Chem.* 14: 259-66.
- Guy H.R.** (1984). Structural model of the acetylcholine receptor channel based on partition energy and helix packing calculations. *Biophys. J.* 45: 249-271.
- Hamilton S.L., Pratt D.R. y Eaton D.C.** (1985). Arrangement of the subunits of the nicotinic acetylcholine receptor of *Torpedo californica* as determined by α -neurotoxin cross-linking. *Biochemistry* 24: 2210-2216.
- Haverstick D.M., Glaser M.** (1989). Influence of proteins on the reorganization of phospholipid bilayers into large domains. *Biophys J.* 55: 677-82.

- Heidmann T., Bernhardt J., Neumann E., Changeux J.P.** (1983). Rapid kinetics of agonist binding and permeability response analyzed in parallel on acetylcholine receptor rich membranes from *Torpedo marmorata*. *Biochemistry* 22: 5452-9.
- Heidmann T., Changeux J.P.** (1979). Fast kinetic studies on the allosteric interactions between acetylcholine receptor and local anesthetic binding sites. *Eur J Biochem.* 94: 281-96.
- Heidmann T., Changeux J.P.** (1979). Fast kinetic studies on the interaction of a fluorescent agonist with the membrane-bound acetylcholine receptor from *Torpedo marmorata*. *Eur J Biochem.* 94: 255-79.
- Hess G.P., Cash D.J. y Aoshima H.** (1979). Acetylcholine receptor controlled ion fluxes in membrane vesicles investigated by fast reaction techniques. *Nature* 283: 329-331.
- Hess G.P., Pasquale E.B., Walker J.W. y McNamee M.G.,** (1982). Comparison of acetylcholine receptor-controlled cation flux in membrane vesicles from *Torpedo californica* and *Electrophorus electricus*: Chemical kinetic measurements in the millisecond region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 963-967.
- Heyn M.P., Blume A., Rehorek M., Dencher N.A.** (1981). Calorimetric and fluorescence depolarization studies on the lipid phase transition of bacteriorhodopsin--dimyristoylphosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry* 20: 7109-15.
- Heyn M.P., Cherry R.J., Dencher N.A.** (1981). Lipid--protein interactions in bacteriorhodopsin--dimyristoylphosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry* 20: 840-9.
- Hol W.G., van Duijnen P.T., Berendsen H.J.** (1978). The alpha-helix dipole and the properties of proteins. *Nature* 273: 443-6.
- Hope M.J., Redelmeier T.E., Wong K.F., Rodrigueza W., Cullis P.R.** (1989). Phospholipid asymmetry in large unilamellar vesicles induced by transmembrane pH gradients. *Biochemistry* 28: 4181-7.
- Horvath L.I., Arias H.R., Hankovszky H.O., Hideg K., Barrantes F.J., Marsh D.** (1990). Association of spin-labeled local anesthetics at the hydrophobic surface of acetylcholine receptor in native membranes from *Torpedo marmorata*. *Biochemistry* 29: 8707-13.
- Horvath L.I., Brophy P.J. y Marsh D.** (1988). Influence of lipid headgroup on the specificity and exchange dynamics in lipid-protein interactions. A spin-label study of myelin proteolipid apoprotein-phospholipid complexes. *Biochemistry* 27: 5296-5304.
- Houslay M.D. y Stanley K.K.** (1982). The integration of cholesterol into phospholipid bilayers en *Dynamics of biological membranes*. pp 71-81. J. Wiley and sons eds., NY.
- Hucho F.** (1986). The Nicotinic Acetylcholine Receptor and its Ion Channel. *Eur. J. Biochem.* 158: 211-226.
- Hudson B.S., Harris D.L., Ludescher R.D., Ruggiero A., Cooney-Freed A., Cavalier S.A.** (1986). Fluorescence probe studies of proteins and membranes en *Applications of fluorescence in biomedical sciences*. pp 159-202. Taylor, DL, Waggoner AS, Murphy RF, Lanni F, Birge RR (eds). Alan R. Liss, inc., NY.
- Hwang J., Gheber L.A., Margolis L., Edidin M.** (1998). Domains in cell plasma membranes investigated by near-field scanning optical microscopy. *Biophys J.* 74: 2184-90.

- Ipsen J.H., Mouritsen O.G., Bloom M.** (1990). Relationships between lipid membrane area, hydrophobic thickness, and acyl-chain orientational order. The effects of cholesterol. *Biophys J.* 57: 405-412.
- Ivorra I., Gal B., Fernández A. y Morales A.** (1996). Reconstituted *Torpedo* ClC-O channels can be functionally transplanted to the *Xenopus* oocyte membrane. The 2nd meeting of European Neuroscience. Stransbourg. France.
- Iwata S., Lee J.W., Okada K., Lee J.K., Iwata M., Rasmussen B., Link T.A., Ramaswamy S., Jap B.K.** (1998). Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. *Science* 281: 64-71.
- Jackson M.B.** (1989). Perfection of a synaptic receptor: kinetics and energetics of the acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86: 2199-203.
- Jacobson K., Dietrich C.** (1999). Looking at lipid rafts? *Trends Cell Biol.* 9: 87-91.
- Jacobson K., Papahadjopoulos D.** (1975). Phase transitions and phase separations in phospholipid membranes induced by changes in temperature, pH, and concentration of bivalent cations. *Biochemistry* 14: 152-61.
- Jähnig F., Harlos K., Vogel H., Eibl H.** (1979). Electrostatic interactions at charged lipid membranes. Electrostatically induced tilt. *Biochemistry* 18: 1459-68.
- Jain M.K., Vaz W.L.** (1987). Dehydration of the lipid-protein microinterface on binding of phospholipase A2 to lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* 905: 1-8.
- Jain, M.K., y White H. B.** (1977). Long range order in biomembranes. *Adv. Lipid Res.* 15: 1-60.
- Jaworsky M., Mendelsohn R.** (1985). Fourier-transform infrared studies of CaATPase partitioning in phospholipid mixtures of 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine-d62 with 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylethanolamine and 1-stearoyl-2-oleoylphosphatidylcholine. *Biochemistry* 24: 3422-8.
- Jaworsky M. y Mendelsohn R.** (1986). Fourier transform infrared spectroscopic identification of gel phase domains in reconstituted phospholipid vesicles containing Ca²⁺-ATPase. *Biochim.Biophys.Acta* 860: 491-502.
- Jones O.T., Earnest J.P. y McNamee M.G.** (1987). Solubilization and reconstitution of membrane proteins. En *Biological Membranes. A practical approach*. Cap 5: 151-152. Findlay. J.B.C. y Evans, W.H. (Eds.). IRL Press, Oxford, England.
- Jones O.T. y McNamee M.G.** (1988). Annular and nonannular binding sites for cholesterol associated with the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* 27: 2364-2374.
- Jones O.T., Eubanks J.H., Earnest J.P. y McNamee M.G.** (1988). A minimum number of lipids are required to support the functional properties of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* 27: 3733-3742.
- Kandel E.R. y Siegelbaum S.** (1985). Principles Underlying Electrical and Chemical Synaptic Transmission. En *Principles of Neural Science*. pp 89-98. E.R. Kandel y J.H. Schwartz (Eds.). 2^a edición. Elsevier, New York.
- Karlin A., Akabas M.H.** (1995). Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. *Neuron.* 15: 1231-44..

- Karlin A.** (1993). Structure of nicotinic acetylcholine receptors. *Curr Opin Neurobiol.* 3: 299-309.
- Karlin A., Holtzman E., Yodh N., Lobel P., Wall J. y Hainfeld J.** (1983). The arrangement of the subunits of the acetylcholine receptor of *Torpedo californica*. *J. Biol. Chem.* 258: 6678-6681.
- Karlin A., Kao P.N. y DiPaolo M.** (1986). Molecular pharmacology of the nicotinic acetylcholine receptor. *TIPS* 7: 304-308.
- Katz B.** (1962). The Transmission of impulses from nerves to muscle and the subcellular unit of synaptic action. *Proc. R. Soc. London B* 155: 455-477.
- Katz B.** (1966). Nerve, muscle and Synapse. New York: McGraw-Hill book Company.
- Kauppinen J.K., Moffat D.G., Cameron D.G. y Mantsch H.H.** (1981). Noise in Fourier self-deconvolution. *Appl. Opt.* 20: 1866-1879.
- Kawasaki K., Yin J.J., Subczynski W.K., Hyde J.S., Kusumi A.** (2001). Pulse EPR detection of lipid exchange between protein-rich raft and bulk domains in the membrane: methodology development and its application to studies of influenza viral membrane. *Biophys J.* 80: 738-48.
- Kim J., McNamee M.G.** (1998). Topological disposition of Cys 222 in the alpha-subunit of nicotinic acetylcholine receptor analyzed by fluorescence-quenching and electron paramagnetic resonance measurements. *Biochemistry* 37: 4 680-6.
- Kistler J., Stroud R.M., Klymkowsky M.W., Lalancette R.A. y Fairclough R.H.** (1982). Structure and function of an acetylcholine receptor. *Biophys. J.* 37: 371-383.
- Koenig J.L. y Tabb D.L.** (1980). Analytical Applications of FT-IR to Molecular y Biological Systems (ed. J.R. Durig) pp. 241-255, Reidel Publishing Co. Holland.
- Korlach J., Schwille P., Webb W.W., Feigenson G.W.** (1999). Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 8461-6.
- Kosower E.M.** (1987). A structural and dynamic model for the nicotinic acetylcholine receptor. *Eur. J. Biochem.* 168: 431-449.
- Kotzyba-Hibert F., Grutter T., Goeldner M.** (1999). Molecular investigations on the nicotinic acetylcholine receptor: conformational mapping and dynamic exploration using photoaffinity labeling. *Mol Neurobiol.* 20: 45-59.
- Kouaouci R., Silvius J.R., Graham I., Pezolet M.** (1985). Calcium-induced lateral phase separations in phosphatidylcholine-phosphatidic acid mixtures. A Raman spectroscopic study. *Biochemistry* 24: 7132-40.
- Krauss M., Korr D., Herrmann A., Hucho F.** (2000). Binding properties of agonists and antagonists to distinct allosteric states of the nicotinic acetylcholine receptor are incompatible with a concerted model. *J Biol Chem.* 275: 30196-201.
- Krodel E.K., Beckman R.A., Cohen J.B.** (1979). Identification of a local anesthetic binding site in nicotinic post-synaptic membranes isolated from *Torpedo marmorata* electric tissue. *Mol Pharmacol.* 15: 294-312.

- Krouse M.E., Nass M.M., Nerbonne J.M., Lester H.A. Wasserman N.H. y Erlanger B.F.** (1980). Receptors for Neurotransmitters, Hormones and Pheromones in Insects (Satelle, D.B. et al., Eds.) pp 17-27. Elsevier/North- Holland, New York.
- Kubalek E., Ralston S., Lindstrom J. y Unwin N.** (1987). Location of subunits with the acetylcholine receptor by electron image analysis of tubular crystals from *Torpedo marmorata*. *J. Cell. Biol.* 105: 9-18.
- Kuffer S.W. y Yoshikami D.** (1975). The number of transmitter molecules in a quantum: an estimate from iontophoretic application of acetylcholine at the neuromuscular synapse. *J. Physiol.* 251: 465-482.
- Lackowicz J.R.** (1983). Principles of Fluorescence Spectroscopy. Plenum Press, New York
- Lackowicz J.R.** (1999). Principles of Fluorescence Spectroscopy. Kluwer academic/Plenum Press, New York
- Laemmli U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. *Nature* 227: 680-685.
- Laroche G., Dufourc E.J., Dufourcq J., Pezolet M.** (1991). Structure and dynamics of dimyristoylphosphatidic acid/calcium complexes by ²H NMR, infrared, spectroscopies and small-angle x-ray diffraction. *Biochemistry* 30: 3105-14.
- Lasalde J.A., Tamamizu S., Butler D.H., Vibat C.R., Hung B., McNamee M.G.** (1996). Tryptophan substitutions at the lipid-exposed transmembrane segment M4 of *Torpedo californica* acetylcholine receptor govern channel gating. *Biochemistry* 35: 14139-48.
- Lechleiter J., Wells M., Gruener R.** (1986). Halothane-induced changes in acetylcholine receptor channel kinetics are attenuated by cholesterol. *Biochim Biophys Acta* 856: 64 0-5.
- Leibel W.S., Firestone L.L., Legler D.C., Braswell L.M., Miller K.W.** (1987). Two pools of cholesterol in acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo*. *Biochim Biophys Acta* 897: 249-60.
- Leibowitz M.D. y Dione V.E.** (1984) Single channel acetylcholine receptor kinetics. *Biophys. J.* 45: 153-163.
- Lentz B.R., Barenholz Y., Thompson T.E.** (1976). Fluorescence depolarization studies of phase transitions and fluidity in phospholipid bilayers. 2 Two-component phosphatidylcholine liposomes. *Biochemistry* 15: 4529-37.
- Lentz B.R., Moore B.M., Barrow D.A.** (1979). Light-scattering effects in the measurement of membrane microviscosity with diphenylhexatriene. *Biophys J.* 25: 4 89-94.
- Lester H.A.** (1992). The permeation pathway of neurotransmitter-gated ion channels. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 21: 267-92
- Levine Y.K., Wilkins M.H.** (1971). Structure of oriented lipid bilayers. *Nat New Biol.* 230: 69-72.
- Lindstrom J., Anholt R., Einarson B., Engle A., Osame M. y Montal M.** (1980). Purification of acetylcholine receptor and reconstitution into lipid vesicles and study of agonist-induced cation channel regulation. *J. Biol. Chem.* 255: 834 0-8350.
- Lindstrom J., Gullick W., Conti-Tronconi B.M. y Ellisman M.** (1980). Proteolytic nicking of the acetylcholine receptor. *Biochemistry* 19: 4791-4795.

- Lindstrom J., Merlie J. y Yogeewaran G.** (1979). Biochemical properties of acetylcholine receptor subunits from *Torpedo californica*. *Biochemistry* 18: 4465-4470.
- Liu L.P., Deber C.M.** (1997). Anionic phospholipids modulate peptide insertion into membranes. *Biochemistry* 36:5476-82.
- London E. y Feigenson G.W.** (1981) Fluorescence quenching in model membranes. 2. Determination of the local lipid environment of the calcium adenosinetriphosphate from sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* 20: 1939-1948.
- Lopes C.M., Louro S.R.** (1991). The effects of n-alkanols on the lipid/protein interface of Ca(2+)-ATPase of sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1070: 467-73.
- Lopez M.M., Kosk-Kosicka D.** (1995). How do volatile anesthetics inhibit Ca(2+)-ATPases? *J Biol Chem.* 270: 28239-45.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J.** (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-270.
- Luan P., Yang L. y Glaser M.** (1995). Formation of membrane domains created during the budding of vesicular stomatitis virus. A model for selective lipid and protein sorting in biological membranes. *Biochemistry* 34: 9874-9883.
- Mabrey S., Mateo P.L., Sturtevant J.M.** (1978). High-sensitivity scanning calorimetric study of mixtures of cholesterol with dimyristoyl- and dipalmitoylphosphatidylcholines. *Biochemistry* 17: 2464-8.
- Machold J., Weise C., Utkin Y., Tsetlin V., Hucho F.** (1995). The handedness of the subunit arrangement of the nicotinic acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *Eur J Biochem.* 234: 427-30.
- Maelicke A., Fulpius B.M., Klett R.P. y Reich E.** (1977). Acetylcholine receptor responses to drug binding. *J. Biol. Chem.* 252: 4811-4830.
- Mantsch H.H., Yang P.W., Martin A., Cameron D.G.** (1988). Infrared spectroscopic studies of *Acholeplasma laidlawii* B membranes. Comparison of the gel to liquid-crystal phase transition in intact cells and isolated membranes. *Eur J Biochem.* 178: 335-41.
- Mantsch H.H. y McElhaney R.N.** (1991). Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy. *Chem.Phys.Lipids* 57: 213-226.
- Marsh D. y Barrantes F.J.** (1978). Immobilized lipid in acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 75: 4329-4333.
- Martínez-Carrión M., González-Ros J.M., Mattingly J.R., Ferragut J.A., Farach M.C. y Donnelly D.** (1984). Fluorescence probes for the study of acetylcholine receptor function. *Biophys. J.* 45: 141-143.
- Mateo C.R., Lillo M.P., Brochon J.C., Martínez-Ripoll M., Sanz-Aparici, J. y Acuña A.U.** (1993). Rotational dynamics of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene and derivatives from fluorescence depolarization. *J. Phys. Chem.* 97: 3486-3491.
- Mathews-Bellinger J. y Salpeter M.M.** (1978). Distribution of acetylcholine receptors at frog neuromuscular junctions with a discussion of some physiological implications. *J. Physiol.* (London) 279: 197-213.

- McCarthy M.P., Moore M.A.** (1992). Effects of lipids and detergents on the conformation of the nicotinic acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *J Biol Chem.* 267: 7655-63.
- McNamee M.G. y Ochoa E.L.M.** (1982). Reconstitution of acetylcholine receptor function in model membranes. *Neurosc.* 7: 2305-2319.
- McNamee M.G., Jones O.T. y Fong, T.M.** (1986) Function of acetylcholine receptors in reconstituted liposomes, pp: 231-273. Findlay, J.B.C. y Evans, W. (eds.) IRL Press. England, Oxford.
- McNamee M.G., Jones O.T., Fong T.M.** (1987). Function of AcChRs in Reconstituted Liposomes. Irl Press, England: 231-273.
- Mebs D., Narita K., Iwanaga S., Samejima Y. y Lee C.-Y.** (1972). Purification, properties and amino acid sequence of α -Bungarotoxin from the venom of Bungarus multicinctus. Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* 353: 243-262.
- Mendelsohn R. y Mantsch H.H.** (1986). Fourier transform infrared studies of lipid-protein interaction. *In Progress in Protein-Lipid Interactions*. A. Watts and A. De Pont, editors. Elsevier/Amsterdam.103-146.
- Méthot N., Baenziger J.E.** (1998). Secondary structure of the exchange-resistant core from the nicotinic acetylcholine receptor probed directly by infrared spectroscopy and hydrogen/deuterium exchange. *Biochemistry* 37: 14815-22.
- Méthot N., Demers C.N., Baenziger J.E.** (1995). Structure of both the ligand- and lipid-dependent channel-inactive states of the nicotinic acetylcholine receptor probed by FTIR spectroscopy and hydrogen exchange. *Biochemistry* 34: 15142-9.
- Méthot N., McCarthy M.P., Baenziger J.E.** (1994). Secondary structure of the nicotinic acetylcholine receptor: implications for structural models of a ligand-gated ion channel. *Biochemistry* 33: 7709-17.
- Mielke D.L., Wallace B.A.** (1988). Secondary structural analyses of the nicotinic acetylcholine receptor as a test of molecular models. *J Biol Chem.* 263: 3177-82.
- Mihovilovic M., Richman D.P.** (1984). Modification of alpha-bungarotoxin and cholinergic ligand-binding properties of *Torpedo* acetylcholine receptor by a monoclonal anti-acetylcholine receptor antibody. *J Biol Chem.*259:15051-9.
- Miyazawa A., Fujiyoshi Y., Stowell M., Unwin N.** (1999). Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall. *J Mol Biol* 288: 765-86.
- Moffatt D.J. y Mantsch H.H.** (1992). Fourier Resolution Enhancement of Infrared Spectral Data. *Meth.Enzymol.* 210:192-200.
- Montal M., Labarca P., Fredkin D.R. y Suarez -Isla B.A.** (1984). Channel properties of the purified acetylcholine receptor from *Torpedo californica* reconstituted in planar lipid bilayers membranes. *Biophys. J.* 45: 165-174.
- Moolenaar W.H., Kruijer W., Tilly B.C., Verlaan I., Bierman A.J., de Laat S.W.** (1986). Growth factor-like action of phosphatidic acid. *Nature* 323: 171-3.
- Moore W.M. y Raftery M.A.** (1980). Direct spectroscopies studies of cation translocation by *Torpedo* acetylcholine receptor on a time scale of physiological relevance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 4509-4513.

- Moore W.M., Holliday L.A., Puett D. y Brady R.N.** (1974). On the conformation of the acetylcholine receptor protein from *Torpedo nobiliana*. *FEBS Lett.* 45: 145-149.
- Mouritsen O.G., Jorgensen K.** (1994). Dynamical order and disorder in lipid bilayers. *Chem Phys Lipids.* 73: 3-25.
- Mouritsen O.G. y Bloom M.** (1993). Models of lipid-protein interactions in membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22: 145-71.
- Muczynski K.A., Stahl W.L.** (1983). Incorporation of dansylated phospholipids and dehydroergosterol into membranes using a phospholipid exchange protein. *Biochemistry* 22: 6037-48.
- Nabet A., Boggs J.M., Pezolet M.** (1994). Study by infrared spectroscopy of the interaction of bovine myelin basic protein with phosphatidic acid. *Biochemistry* 33: 14792-9.
- Narayanaswami V., McNamee M.G.** (1993). Protein-lipid interactions and *Torpedo californica* nicotinic acetylcholine receptor function. 2. Membrane fluidity and ligand-mediated alteration in the accessibility of gamma subunit cysteine residues to cholesterol. *Biochemistry* 32: 12420-7.
- Naumann D., Schultz C., Gorne-Tschelnokow U., Hucho F.** (1993). Secondary structure and temperature behaviour of the acetylcholine receptor by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* 32: 3162-8.
- Neubig R.R. y Cohen J.B.** (1979). Equilibrium binding of (³H) tubocurarine and (³H) acetylcholine by *Torpedo* postsynaptic membranes: stoichiometry and ligand interactions. *Biochemistry* 18: 5464-75.
- Neubig R.R. y Cohen J.B.** (1980). Permeability control by cholinergic receptors in *Torpedo* post-synaptic membranes: agonist dose-response relations measured at second and millisecond times. *Biochemistry* 19: 2770-2779.
- Neubig R.R., Krodel E. K., Boyd N.D. y Cohen J.B.** (1979). Acetylcholine and local anesthetic binding to *Torpedo* nicotinic post-synaptic membranes after removal of non-receptor peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 690-694.
- Noda M., Takahashi H., Tanabe T., Toyosato M., Kikuyotani S., Furutani Y., Hirose T., Takashima H., Inayama S., Miyata T., y Numa S.** (1983). Structural homology of *Torpedo californica* acetylcholine receptor subunits. *Nature* 302: 528-532.
- Numa S., Noda M., Takahashi H., Tanabe T., Toyosato M., Furutani Y. y Kikuyotani S.** (1983). Molecular structure of the nicotinic acetylcholine receptor. *Mol. Neurobiol.* 156: 57-69.
- Ochoa E.L., Chattopadhyay A., y McNamee M.G.** (1989). Desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor: molecular mechanisms and effect of modulators. *Cell Mol. Neurobiol.* 9:141-178.
- Ochoa E.L.M., Dalziel A.W. y McNamee M.G.** (1983). Reconstitution of acetylcholine receptor function in lipid vesicles of defined composition. *Biochim. Biophys. Acta* 727: 151-162.
- Oliferenko S., Paiha K., Harder T., Gerke V., Schwarzler C., Schwarz H., Beug H., Gunthert U., Huber LA.** (1999). Analysis of CD44-containing lipid rafts: Recruitment of annexin II and stabilization by the actin cytoskeleton. *J Cell Biol.* 146: 843-54.
- Op den Kamp J.A.** (1979). Lipid asymmetry in membranes. *Annu Rev Biochem.* 48: 47-71.
- Ortells M.O., Lunt G.G.** (1996). A mixed helix-beta-sheet model of the transmembrane region of the nicotinic acetylcholine receptor. *Protein Eng.* 9: 51-9.

- Ortells M.O., Cockcroft V.B., Lunt G.G., Marsh D., Barrantes F.J.** (1992). The nicotinic acetylcholine receptor and its lipid microenvironment. In: Pullman, A., Jortner, J., Pullman, B., eds. *Membrane proteins: Structures, interactions and models*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 185-198.
- Parasassi T., De Stasio G., d'Ubaldo A., Gratton E.** (1990). Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. *Biophys J.* 57: 1179-86.
- Parasassi T., De Stasio G., Ravagnan G., Rusch R.M., Gratton E.** (1991). Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophys J.* 60: 179-89.
- Parasassi T., Ravagnan G., Rusch R.M., Gratton E.** (1993). Modulation and dynamics of phase properties in phospholipid mixtures detected by Laurdan fluorescence. *Photochem Photobiol.* 57: 403-10.
- Paraschos A., González-Ros J.M. y Martínez-Carrión M.** (1982). Acetylcholine receptor from *Torpedo*. Preferential solubilization and efficient reintegration into lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 691: 249-260.
- Paraschos A., González-Ros J.M. y Martínez-Carrión M.** (1983). Absorption Filtration: a tool for measurement of ion tracer flux in native membranes and reconstituted lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 733: 223-233.
- Parente R.A., Lentz B.R.** (1985). Advantages and limitations of 1-palmitoyl-2-[[2-[4-(6-phenyl-trans-1,3,5-hexatrienyl)phenyl]ethyl]carbonyl]-3- sn-phosphatidylcholine as a fluorescent membrane probe. *Biochemistry* 24: 6178-85.
- Paternostre M.T., Roux M. y Rigaud J.L.** (1988). Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 1. Solubilization of large unilamellar liposomes (prepared by reverse-phase evaporation) by Triton X-100, Octyl Glucoside, and sodium cholate. *Biochemistry* 27: 2668-2688.
- Pedersen S.E. y Cohen J.B.** (1990) d-Tubocurarine binding sites are located at α and α - β subunit interfaces of the nicotinic acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 2785-2789.
- Phillips W.D., Maimone M.M., Merlie J.P.** (1991). Mutagenesis of the 43-kD postsynaptic protein defines domains involved in plasma membrane targeting and AChR clustering. *J Cell Biol.* 115: 1713-23.
- Pink D.A., Chapman D., Laidlaw D.J. y Wiedmer T.** (1984). Electron spin resonance and steady state fluorescence depolarization studies of lipid bilayers containing integral proteins. *Biochemistry* 23: 4051-4058.
- Polozov I.V., Polozova A.I., Molotkovsky J.G., Epand R.M.** (1997). Amphipathic peptide affects the lateral domain organization of lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* 1328: 125-39.
- Polozova A., Litman B.J.** (2000). Cholesterol dependent recruitment of di22:6-PC by a G protein-coupled receptor into lateral domains. *Biophys J.* 79: 2632-43.
- Popot J.L. y Changeux J.P.** (1984). Nicotinic receptor of acetylcholine: structure of oligomeric integral membrane protein. *Physiol. Rev.* 64: 1162-1239.
- Portis A., Newton C., Pangborn W., Papahadjopoulos D.** (1979). Studies on the mechanism of membrane fusion: evidence for an intermembrane Ca^{2+} -phospholipid complex, synergism with Mg^{2+} , and inhibition by spectrin. *Biochemistry* 18: 780-90.

- Pott T., Maillet J.C., Dufourc E.J.** (1995). Effects of pH and cholesterol on DMPA membranes: a solid state ^2H - and ^31P -NMR study. *Biophys J.* 69: 1897-908.
- Qian Z., Drewes L.R.** (1991). Cross-talk between receptor-regulated phospholipase D and phospholipase C in brain. *FASEB J.* 5: 315-9.
- Rafferty M.A., Dunn S.M.J., Conti-Tronconi B.M., Middlemas D.S. y Crawford R.D.** (1983) The nicotinic acetylcholine receptor: Subunit structure, functional binding sites and ion transport properties. *Molecular Neurobiology. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 48: 21-23.
- Raines D.E. y Krishnan N.S.** (1998). Transient low-affinity agonist binding to *Torpedo* postsynaptic membranes resolved by using sequential mixing stopped-flow fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* 37: 956-64.
- Raines D.E. y Miller K.W.** (1993). The role of charge in lipid selectivity for the nicotinic acetylcholine receptor. *Biophys.J.* 64: 632-641.
- Ratman M., Le Nguyen D., Rivier J. Sargent P.B. y Lindstrom J.M.** (1986). Transmembrane topography of nicotinic acetylcholine receptor: immunochemical test contradict theoretical predictions based on hidrofobicity profiles. *Biochemistry* 25: 2633-2643.
- Rankin S.E., Addona G.H., Kloczewiak M.A., Bugge B., Miller K.W.** (1997). The cholesterol dependence of activation and fast desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biophys J.* 73: 2446-55.
- Raudino A.** (1995). Lateral inhomogeneous lipid membranes: theoretical aspects. *Adv Colloid Interface Sci.* 57: 229-85.
- Reichardt L.F. y Kelly R.B.** (1983). A molecular description of nerve terminal function. *Ann.Rev.Biochem.* 52: 871-926.
- Reynolds J. y Karlin A.** (1978). Molecular weight in detergent solution of acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *Biochemistry* 17: 2035-2039.
- Rinia H.A., Kik R.A., Demel R.A., Snel M.M., Killian J.A., van Der Eerden J.P., de Kruijff B.** (2000). Visualization of highly ordered striated domains induced by transmembrane peptides in supported phosphatidylcholine bilayers. *Biochemistry* 39: 5852-8.
- Riquelme G., Lopez E., Garcia-Segura L.M., Ferragut J.A. y González-Ros J.M.** (1990) Giant liposomes: A model system in which to obtain patch-clamp recordings of ionic channels. *Biochemistry* 29: 11215-11222.
- Rogers J., Lee A.G., Wilton D.C.** (1979). The organisation of cholesterol and ergosterol in lipid bilayers based on studies using non-perturbing fluorescent sterol probes. *Biochim Biophys Acta* 552: 23-37.
- Rothschild K.J., Clark N.A.** (1979). Anomalous amide I infrared absorption of purple membrane. *Science* 204: 311-2.
- Ruppel D., Kapitza H.G., Galla H.J., Sixl F. y Sackmann, E.** (1982). On the microstructure and phase diagram of dimyristoylphosphatidylcholine-glycophorin bilayers: The role of defects and the hydrophilic lipid-protein interaction. *Biochim Biophys. Acta.* 692: 1-17.
- Ryan SE, Baenziger JE.** (1999). A structure-based approach to nicotinic receptor pharmacology. *Mol Pharmacol.* 55: 348-55.

- Ryan S.E., Blanton M.P., Baenziger J.E.** (2001). A Conformational Intermediate Between the Resting and Desensitized States of the Nicotinic Acetylcholine Receptor. *J Biol Chem.* 276: 4796-4803
- Rytömaa M., Kinnunen P.K.** (1996). Dissociation of cytochrome c from liposomes by histone H1. Comparison with basic peptides. *Biochemistry* 35: 4529-39.
- Sabra M.C., Mouritsen O.G.** (1998). Steady-state compartmentalization of lipid membranes by active proteins. *Biophys J.* 74 (2 Pt 1): 745-52.
- Sali D., Bycroft M., Fersht A.R.** (1988). Stabilization of protein structure by interaction of alpha-helix dipole with a charged side chain. *Nature* 335:740-3.
- Salmon A., Dodd S.W., Williams G.D., Beach J.M. y Brown M.F.** (1987). Configurational statistics of acyl chains in polyunsaturated lipid bilayers from ²H NMR. *J. Am. Chem. Soc.* 109: 2600-2609.
- Salome L., Cazeils J.L., Lopez A., Tocanne J.F.** (1998). Characterization of membrane domains by FRAP experiments at variable observation areas. *Eur Biophys J* 27: 391-402
- Sanes J.R., Lichtman J.W.** (1999). Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci.* 22:389-442.
- Sankaram M.B., Brophy P. J., Jordi W. y Marsh D.** (1990). Fatty acid pH titration and the selectivity of interaction with extrinsic proteins in dimyristoylphosphatidylglycerol dispersions. Spin label ESR studies. *Biochim. Biophys. Acta.* 1021: 63-69.
- Savitsky A. y Golay M.J.E.** (1964). Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Anal. Chem.* 36: 1627-1639.
- Schindler H., Spillecke F., Neumann E.** (1984). Different channel properties of *Torpedo* acetylcholine receptor monomers and dimers reconstituted in planar membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81: 6222-6.
- Schmidt J.Y. y Raftery M.A.** (1973) A simple assay for the study of solubilized acetylcholine receptors. *Analyt. Biochem.* 52: 349-354.
- Schroeder R., London E., Brown D.** (1994). Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behaviour. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 12130-4.
- Schütz G.J., Kada G., Pastushenko V.P., Schindler H.** (2000). Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *EMBO J.* 19: 892-901.
- Scotto A.W., Zakim D.** (1986). Reconstitution of membrane proteins: catalysis by cholesterol of insertion of integral membrane proteins into preformed lipid bilayers. *Biochemistry* 25: 1555-61.
- Sealock R., Wray B.E. y Froehner S.C.** (1984). Ultrastructural localization of the M_r 43.000 protein and the acetylcholine receptor in *Torpedo* postsynaptic membranes using monoclonal antibodies. *J. Cell. Biol.* 98: 2239-44.
- Sedzik J., Blaurock A.E., Hochli M.** (1984). Lipid/myelin basic protein multilayers. A model for the cytoplasmic space in central nervous system myelin. *J Mol Biol.* 174: 385-409.
- Simons K., Ikonen E.** (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-72.
- Simons K., van Meer G.** (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27: 6197-202.

- Simson R., Yang B., Moore S.E., Doherty P., Walsh F.S., Jacobson K.A.** (1998). Structural mosaicism on the submicron scale in the plasma membrane. *Biophys J.* 74: 297-308.
- Sine S.M., Claudio T.** (1991). Gamma- and delta-subunits regulate the affinity and the cooperativity of ligand binding to the acetylcholine receptor. *J Biol Chem.* 266: 19369-77.
- Sine S.M. y Steinbach J.H.** (1984). Agonist blocks currents through acetylcholine receptor channels. *Biophys. J.* 46: 277-284.
- Sine S.M. y Taylor P.** (1980). The relationship between agonist occupation and the permeability response of the cholinergic receptor revealed by bound cobra α -toxin. *J. Biol. Chem.* 255: 10144-10156.
- Singer S.J., Nicolson G.L.** (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720-31.
- Secar L.A., Hudson B.S., Petersen M., Diamond J.** (1977). Conjugated polyene fatty acids on fluorescent probes: spectroscopic characterization. *Biochemistry* 16 (5): 813-818.
- Sklar L.A., Miljanich G.P., Dratz E.A.** (1979). Phospholipid lateral phase separation and the partition of cis-parinaric acid and trans-parinaric acid among aqueous, solid lipid, and fluid lipid phases. *Biochemistry* 18: 1707-16.
- Smutzer G., Yeagle P.L.** (1985). A fluorescence anisotropy study on the phase behaviour of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol mixtures. *Biochim Biophys Acta* 814: 274-80.
- Soumpasis D.M.** (1983). Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophys. J.* 41: 95-97.
- Sperotto M.M., Mouritsen O.G.** (1993). Lipid enrichment and selectivity of integral membrane proteins in two-component lipid bilayers. *Eur Biophys J* 22: 323-8.
- Stroud R.M. y Finer-Moore J.** (1985). Acetylcholine receptor structure, function, and evolution. *Ann.Rev.Cell.Biol.* 1: 317-351.
- Sundler R., Papahadjopoulos D.** (1981). Control of membrane fusion by phospholipid head groups. I. Phosphatidate/phosphatidylinositol specificity. *Biochim Biophys Acta* 649:743-50.
- Sunshine C., McNamee M.G.** (1994). Lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function: the role of membrane lipid composition and fluidity. *Biochim Biophys Acta* 1191: 59-64.
- Sunshine C. y McNamee M.G.** (1992). Lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function: the role of neutral and negatively charged lipids. *Biochim.Biophys.Acta* 1108:240-246.
- Surewicz W.K., Mantsch H.H.** (1988). New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra. *Biochim Biophys Acta* 952: 115-30.
- Takai T., Noda M., Mishina M., Shimizu S., Furutani Y., Kayano T., Ikeda T., Kubo T., Takahashi H., Takahashi T.** (1985). Cloning, sequencing and expression of cDNA for a novel subunit of acetylcholine receptor from calf muscle. *Nature* 315: 761-4.
- Tamamizu S., Guzman G.R., Santiago J., Rojas L.V., McNamee M.G., Lasalde-Dominicci J.A.** (2000). Functional effects of periodic tryptophan substitutions in the alpha M4 transmembrane domain of the *Torpedo californica* nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* 39: 4666-73.

- Teale F.W.** (1969). Fluorescence depolarization by light-scattering in turbid solutions. *Photochem Photobiol.* 10: 363-74.
- Thomas D.D., Caslens W.F. y Stryer L.** (1978). Fluorescence energy transfer in the rapid diffusion limit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 5746-5750.
- Tikhonov D.B., Zhorov B.S.** (1998). Kinked-helices model of the nicotinic acetylcholine receptor ion channel and its complexes with blockers: simulation by the Monte Carlo minimization method. *Biophys J.* 74: 242-55.
- Tobimatsu T., Fujita Y., Fukuda K., Tanaka K., Mori Y., Konno T., Mishina M., Numab S.** (1987). Effects of substitution of putative transmembrane segments on nicotinic acetylcholine receptor function. *FEBS Lett.* 222: 56-62.
- Tocanne J.F., Teissie J.** (1990). Ionization of phospholipids and phospholipid-supported interfacial lateral diffusion of protons in membrane model systems. *Biochim Biophys Acta* 1031:111-42.
- Toyoshima C. y Unwin N.** (1990). Three-dimensional structure of the acetylcholine receptor by cryoelectron microscopy and helical image reconstruction. *J. Cell. Biol.* 111: 2623-2635.
- Trotter P.J., Storch J.** (1989). 3-[p-(6-phenyl)-1,3,5-hexatrienyl]phenylpropionic acid (PA-DPH): characterization as a fluorescent membrane probe and binding to fatty acid binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 982: 131-9.
- Tsukihara T., Aoyama H., Yamashita E., Tomizaki T., Yamaguchi H., Shinzawa-Itoh K., Nakashima R., Yaono R., Yoshikawa S.** (1996). The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 272: 1136-44.
- Udgaonkar J.B., Hess G.P.** (1986). Acetylcholine receptor kinetics: chemical kinetics. *J Membr Biol.* 93: 93-109.
- Unwin N.** (1996). Projection structure of the nicotinic acetylcholine receptor: distinct conformations of the alpha subunits. *J Mol Biol.* 257: 586-96.
- Unwin N.** (1998). The nicotinic acetylcholine receptor of the *Torpedo* electric ray. *J Struct Biol.* 121: 181-90.
- Unwin N.** (1993). Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *J.Mol.Biol.* 229:1101-1124.
- Unwin N.** (1995). Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature* 373:37-43.
- Valenzuela C.F., Weign P., Yguerabide J., y Jonson D.A.** (1994). Transverse distance between the membrane and the agonist binding sites on the *Torpedo* acetylcholine receptor: a fluorescence study. *Biophys. J.* 66: 674-682.
- Valeur B., Weber G.** (1977). Resolution of the fluorescence excitation spectrum of indole into the 1La and 1Lb excitation bands. *Photochem Photobiol.* 25: 441-4.
- van Blitterswijk W.J., van der Meer B.W. y Hilkmann H.** (1987). Quantitative contributions of cholesterol and individual classes of phospholipids and their degree of fatty acid (Un) saturation to membrane fluidity measured by fluorescence polarization. *Biochemistry* 26: 1746-1756.
- van Deenen L.L.** (1981). Topology and dynamics of phospholipids in membranes. *FEBS Lett.* 123: 3-15.

- van Dijk P.W., de Kruijff B., Verkleij A.J., van Deenen L.L., de Gier J.** (1978). Comparative studies on the effects of pH and Ca²⁺ on bilayers of various negatively charged phospholipids and their mixtures with phosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* 512: 84-96.
- Vaz, W.L.C, Melo, E.C.C. y Thompson, T.E.** (1989). Translational diffusion and fluid domain connectivity in a two-component, two-phase phospholipid bilayer. *Biophysical Journal*, 56: 869-876.
- Vaz, W.L.C.** (1994). Diffusion and chemical reactions in phase-separated membranes. *Biophysical chemistry* 50: 139-145.
- Verkleij A.J., Mommers C., Gerritsen W.J., Leunissen-Bijvelt L., Cullis P.R.** (1979). Fusion of phospholipid vesicles in association with the appearance of lipidic particles as visualized by freeze fracturing. *Biochim Biophys Acta*. 555: 358-61.
- Vijayaraghavan S., Huang B., Blumenthal E.M., Berg D.K.** (1995). Arachidonic acid as a possible negative feedback inhibitor of nicotinic acetylcholine receptors on neurons. *J Neurosci*. 5 Pt 1: 3679-87.
- Villar M.T., Artigues A., Ferragut J.A. y González Ros J.M.** (1988). Phospholipase A2 hydrolysis of membrane phospholipids causes structural alteration of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochim. Biophys. Acta* 938: 35-43.
- von Heijne G., Gavel Y.** (1988). Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur J Biochem*. 174: 671-8.
- Wallin E., Tsukihara T., Yoshikawa S., von Heijne G., Elofsson A.** (1997). Architecture of helix bundle membrane proteins: an analysis of cytochrome c oxidase from bovine mitochondria. *Protein Sci*. 6: 808-15.
- Wang F., Naisbitt G.H., Vernon L.P., Glaser M.** (1993). Pyruvate thionin binding to and the role of tryptophan-8 in the enhancement of phosphatidylserine domains in erythrocyte membranes. *Biochemistry* 32: 12283-89.
- Wang T.Y., Leventis R., Silviu J.R.** (2000). Fluorescence-based evaluation of the partitioning of lipids and lipidated peptides into liquid-ordered lipid microdomains: a model for molecular partitioning into "lipid rafts". *Biophys J*. 79: 919-33.
- Wang Z.Z., Hardy S.F., Hall Z.W.** (1996). Assembly of the nicotinic acetylcholine receptor. The first transmembrane domains of truncated alpha and delta subunits are required for heterodimer formation in vivo. *J Biol Chem*. 271: 27575-84.
- Watters D. y Maelicke A.** (1983). Organization of ligand binding sites at the acetylcholine receptor: a study with monoclonal antibodies. *Biochemistry* 22: 1811-1819.
- Welti R., Glaser M.** (1994). Lipid domains in model and biological membranes. *Chem Phys Lipids*. 73(1-2): 121-37.
- Whetton A.D. y Houslay M.D.** (1983) 5-Nucleotidase is activated upon cholesterol-depletion of liver plasma membranes. *FEBS Lett*. 157: 70-74.
- Whetton A.D., Gordon L.M. y Houslay M.D.** (1983) Elevated membrane cholesterol concentrations inhibit glucagon-stimulated adenylate cyclase. *Biochem.J*. 210: 437-44 9.
- Whittaker V.P., Michaelson I.A. y Kirkland R.A.J.** (1964) The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles ("synaptosomes") *Biochem. J*. 128: 833-846.

- Witzemann V. y Raftery M.** (1978). Ligand binding sites and subunit interactions of *Torpedo californica* acetylcholine receptor. *Biochemistry* 17: 3593-3604.
- Wrigglesworth J.M. Wooster M.S., Elsdén J., y Danneel, H-J.** (1987). Dynamics of proteoliposome formation. Intermediate states during detergent dialysis. *Biochem J.* 246: 737-744.
- Wu C.S., Sun X.H., Yang J.T.** (1990). Conformation of acetylcholine receptor in the presence of agonists and antagonists. *J Protein Chem.* 9:119-26.
- Wu W.C., Raftery M.A.** (1981). Functional properties of acetylcholine receptor monomeric and dimeric forms in reconstituted membranes. *Biochem Biophys Res Commun.* 99:436-44.
- Yager P., Chang E.L., Williams R.W. y Dalziel A.W.** (1984). The secondary structure of acetylcholine receptor reconstituted in a single lipid component as determined by Raman spectroscopy. *Biophys. J.* 45: 26-28.
- Yang L., Glaser M.** (1995). Membrane domains containing phosphatidylserine and substrate can be important for the activation of protein kinase C. *Biochemistry* 34:1500-6.
- Yang L., Glaser M.** (1996). Formation of membrane domains during the activation of protein kinase C. *Biochemistry* 35:13966-74.
- Yuen C.T., Davidson A.R., Deber C.M.** (2000). Role of aromatic residues at the lipid-water interface in micelle-bound bacteriophage M13 major coat protein. *Biochemistry* 39:16155-62.
- Zhang Y.-P., Lewis R.N.A.H., Hodges R.S., McElhaney R.N.** (1992). Interaction of Peptide Model of a Hydrophobic Transmembrane Alpha-Helical Segment of a Membrane Protein with Phosphatidylcholine Bilayers: Differential Scanning Calorimetric and FTIR Spectroscopic Studies. *Biochemistry* 31: 11579-11588.
- Zhang Y.-P., Lewis R.N.A.H., Hodges R.S., McElhaney R.N.** (1995). interaction of a peptide model of a hydrophobic transmembrane α -helical segment of a membrane protein with phosphatidylethanolamine bilayers: Differential scanning calorimetric and Fourier transform infrared spectroscopic studies. *Biophys.J.* 68: 847-857.

APÉNDICE



1.- Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

1.1.- Introducción

El uso de la espectroscopia infrarroja en el estudio de la estructura molecular se desarrolló a partir de la primera mitad del siglo XX. La posibilidad de obtener información de la conformación de proteínas a partir de las bandas de vibración del espectro de infrarrojo se estableció en los años cincuenta antes de disponer de buenos resultados con la técnica de difracción de rayos X. La espectroscopia de infrarrojo obtiene información de la energía vibracional de enlace y por ello no necesita sondas que puedan perturbar la muestra a estudiar. Su escala temporal es de 10^{-12} s, frente a 10^{-8} y 10^{-5} de ESR y RMN, respectivamente.

1.2.- Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

Los espectrómetros de infrarrojo con transformada de Fourier producen un patrón interferométrico después de que la luz atraviese la muestra y llegue al detector. El interferómetro de Michelson es todavía el más usado en instrumentos para el estudio de proteínas, aunque también se han desarrollado otros interferómetros para aplicaciones específicas, como el interferómetro de Genzel, el interferómetro de barrido refractivo, el interferómetro rotacional, etc. (Griffiths y De Haseth, 1986). Los datos interferométricos son una representación de la intensidad frente al movimiento del espejo, por tanto temporales, convirtiéndose por la transformada de Fourier en una relación de intensidad vs frecuencia. La transformada de Fourier se calcula con un algoritmo rápido de Fourier seguido de la apodización y corrección de fase. El espectro final resulta de dividir el espectro promedio de un cierto número de barridos en los que la luz incide sobre la muestra entre el espectro promedio que se obtiene cuando la luz no incide sobre la muestra. Se trata de una representación de absorbancia vs frecuencia (**figura 1**).

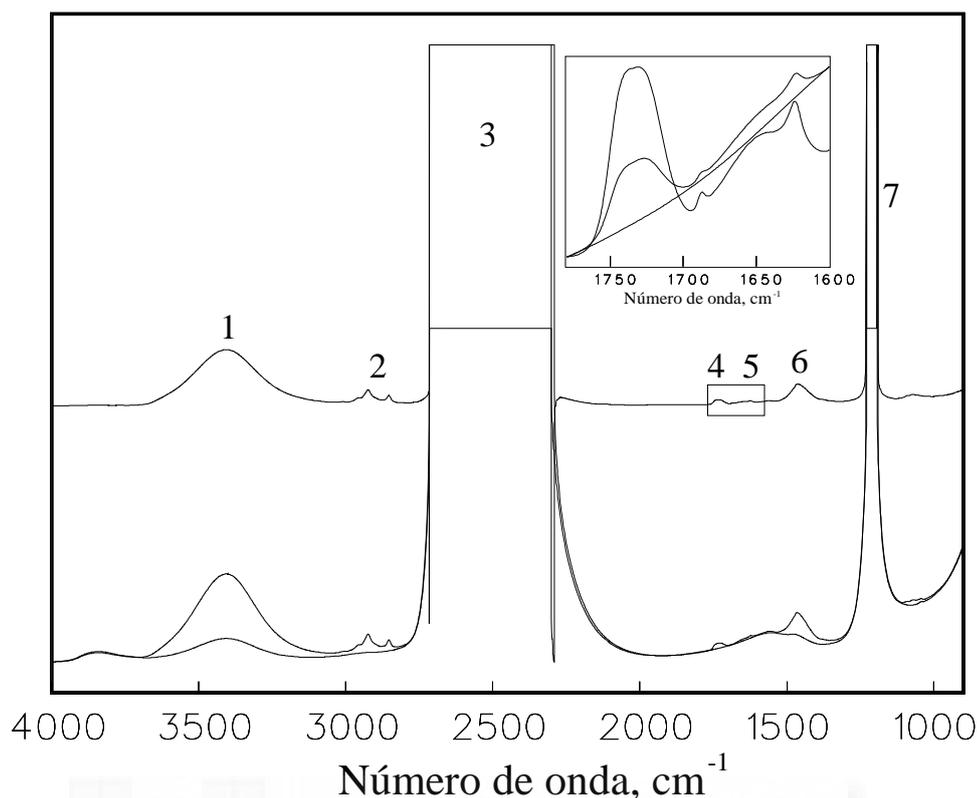


Figura 1. Ejemplo de un espectro de infrarrojo. La traza inferior corresponde a un tampón en agua deuterada, mientras que la traza superior es de una proteína de membrana en el tampón anterior, siendo la traza media el espectro diferencia. El inserto es una ampliación de las bandas amida I (5) y la banda de C=O del enlace éster del fosfolípido (4). Las bandas de absorción más grandes corresponden a las vibraciones de flexión y tensión de D₂O y HOD (1, 3, 6 y 7) y las bandas de (2) son de metilos y metilenos.

Las ventajas que presenta la espectroscopia de FT-IR son:

1) Todas las frecuencias son detectadas simultáneamente y se puede obtener un espectro completo en menos de un segundo. La señal del interferograma es promediada después de varios barridos por lo que la relación señal/ruido es alta (ventaja de Fellgett).

2) El haz de IR incide totalmente sobre la muestra sin necesidad de rejillas para monocromar la luz y no hay limitación de la cantidad de energía que llega al detector. Al permitirse un mayor flujo energético en el sistema hay una mayor sensibilidad (ventaja de Jacquinot).

3) Los instrumentos de FT-IR poseen un láser HeNe que permite una calibración interna de frecuencias de 0.0001 cm^{-1} y la digitalización de los datos (ventaja de Connes). No obstante, la posición de los picos en las bandas de infrarrojo no se hace con tanta precisión debido a la dificultad en obtener un espectro “ideal”.

4) La muestra sufre un pequeño calentamiento dado que se encuentra alejada de la fuente luminosa; no hay contribuciones de emisión de la muestra, lo que facilita el tratamiento matemático de los espectros.

1.3.- Estudio de muestras biológicas

Las moléculas biológicas ejercen sus funciones en solución acuosa por lo que las muestras deben estar contenidas entre ventanas insolubles en agua, por ejemplo de CaF_2 , BaF_2 , ZnS , etc. Sin embargo, en el estudio de proteínas, el agua presenta una gran banda de absorción en la zona de vibración de estas. Por ello, la muestra debe formar una película muy fina para que haya poca absorción por parte del agua ($\leq 10 \mu\text{m}$) o sustituir el agua por D_2O , evitando que se solape la banda acuosa.

1.4.- Aspectos teóricos de la espectroscopia infrarroja

La espectroscopia infrarroja se basa en medidas de transiciones vibracionales, por tanto de pequeña energía, generalmente entre el estado fundamental y el primer estado excitado. El proceso está regido por las leyes de la mecánica cuántica y la energía total de la molécula aumenta o disminuye por uno o más cuantos dependiendo de que tenga lugar la absorción o emisión, respectivamente. En moléculas con vibración armónica, sólo ocurren transiciones entre niveles adyacentes. Pero en realidad las moléculas no vibran armónicamente y la regla de selección no es completamente precisa. A veces se observan transiciones que implican la absorción de más de un cuanto y se denominan sobretonos.

Las vibraciones características de átomos unidos covalentemente se clasifican en dos tipos, a saber, vibraciones de “tensión”, que suponen cambios en la longitud de los enlaces; y vibraciones de “flexión”, que corresponden a cambios en el ángulo de enlace.

Determinados grupos químicos dan bandas de vibración características, independientemente de la molécula a la que pertenezcan. El rango de números de onda en el que aparecen esas bandas se ve afectado por factores inter e intramoleculares. Entre los factores intramoleculares se encuentra la masa atómica de los grupos adyacentes, el acoplamiento mecánico entre grupos similares, la formación de puentes de hidrógeno, simetría, electronegatividad, conjugación, etc. El factor intermolecular más importante es la formación de puentes de hidrógeno.

El espectro de infrarrojo de una molécula compleja como puede ser una proteína se compone de todas las posibles vibraciones de sus grupos químicos, que en ocasiones se solapan dando bandas complejas formadas por varios componentes. La forma de las bandas simples puede ser Lorentziana, Gaussiana o mezcla de ambas y también puede darnos información de las interacciones moleculares locales.

1.5.- *Asignación de bandas de infrarrojo en proteínas.*

El espectro de infrarrojo de polipéptidos y proteínas contiene diversas bandas de absorción relativamente grandes asociadas con el enlace peptídico, representado por el grupo CONH. Al tratarse de bandas asociadas a polipéptidos y proteínas pronto se llamaron de forma común “bandas amida”. Del estudio de pequeñas moléculas como la N-metilacetamida se han podido describir estas bandas. Un grupo CONH plano hipotéticamente aislado posee nueve bandas amida, que se llaman amida A, amida B y amidas I a VII, en orden decreciente de frecuencia. Estas pueden describirse en términos de cambio de coordenadas, en el plano: tensión C=O, tensión C-N, tensión N-H, flexión OCN, flexión CNH; y fuera del plano: torsión C-N, flexión fuera del plano C=O y N-H. Aunque las amidas I, II y III pueden ser consideradas en el estudio de la conformación de las proteínas, normalmente sólo se tiene en cuenta la banda amida I, centrada a 1550 cm^{-1} (Arrondo et al., 1993).

La amida I se produce fundamentalmente por vibraciones de tensión del enlace C=O del enlace peptídico, acopladas con vibraciones de tensión del enlace C-N y de deformación de CCN. La frecuencia de las vibraciones depende de los puentes de H que establezcan los grupos C=O y N-H, y el patrón de puentes de H depende a su vez de la estructura secundaria que adopte la proteína, de ahí la sensibilidad de la banda amida I a cambios en la conformación de las proteínas y péptidos. La posibilidad de disponer de espectros de infrarrojo de proteínas de alta calidad (debido a las mejoras en la instrumentación) y el uso de procedimientos de aumento de resolución han permitido obtener la información contenida en la banda amida I y asignar las distintas bandas a los distintos motivos estructurales (ver **tabla 1**). Dicha asignación se basó en cálculos teóricos (Miyazawa y Blout, 1961) y en estudios realizados con homopolímeros sintéticos de estructura secundaria conocida y homogénea.

Algunas proteínas presentan espectros de infrarrojo cuyos componentes no se ajustan a los recogidos en esta tabla. Es el caso de la bacteriorodopsina, una proteína que se estructura fundamentalmente en α -hélice, y que presenta un máximo en H_2O a 1660 cm^{-1} (Rothschild y Clark, 1979). Estas hélices presentan una conformación que se llama α_{II} , en la que el enlace peptídico plano se inclina sobre el enlace N-H apuntando hacia adentro en la dirección del eje. Este tipo de α -hélices no son equivalentes a las que suelen encontrarse en proteínas solubles. Las hélices 3_{10} tampoco son muy comunes y presentan máximos de vibración a 1665 cm^{-1} , que pueden solaparse con giros T.

Tabla 1. Asignación de frecuencias (cm^{-1}) de componentes de la banda amida I a diferentes motivos de estructura secundaria de proteínas.

Tomado de Arrondo et al., 1993.

Conformación	Simbología	Amida I	
		H ₂ O (cm^{-1})	D ₂ O (cm^{-1})
α -hélice	$\nu(0)_\alpha$	1653 (<i>s</i>)	1650 (<i>s</i>)
		(1648-1655)	(1648-1655)
Hoja β antiparalela	$\nu(\pi,0)_A$	1632 (<i>s</i>)	1632 (<i>s</i>)
	$\nu(0,\pi)_A$	(1630-1636)	(1628-1638)
		1690 (<i>w</i>)	1675 (<i>w</i>)
Hoja β paralela		(1690-1693)	(1672-1678)
	$\nu(\pi,0)_P$	1630 (<i>s</i>)	1632 (<i>s</i>)
	$\nu(0,\pi)_P$	1645 (<i>w</i>)	1648 (<i>w</i>)
Estructura no ordenada	$\nu(m)$	1656 (<i>m, br</i>)	1643 (<i>m, br</i>)
		(1656-1660)	

s, fuerte; *m*, media; *w*, débil; *br*, ancha.

1.6.-Bandas de absorción del agua

Las grandes bandas de absorción del H₂O impiden el estudio de bandas de otros grupos que se solapan con las primeras. En estudios de conformación proteica se elimina la banda de 1645 cm^{-1} del agua sustituyéndola por D₂O. El uso de D₂O en vez de H₂O se postula que no induce cambios en la estructura de la proteína (Graham y Wallach, 1971; Koenig y Tabb, 1980), manteniéndose así mismo la función de la proteína. No obstante, la deuteración de los grupos amida (por ejemplo tras un intercambio isotópico realizado por ultracentrifugación) supone un desplazamiento de las bandas que componen la amida I hacia frecuencias más bajas (Surewicz y Mantsch, 1988), si bien no todas lo hacen en la misma medida (ver **tabla 1**).

1.7.- Procesamiento de datos y técnicas de aumento de resolución

Los espectros de infrarrojo de muestras biológicas, en especial cuando se estudian las señales debidas a proteínas, presentan con frecuencia bandas complejas de absorción que resultan del solapamiento de varias bandas simples. La razón reside en el hecho de que la anchura de estas bandas simples es mayor que la separación entre ellas, lo que impide que sean instrumentalmente separables. Se han desarrollado procedimientos matemáticos que permiten estrechar las bandas y extraer así toda la información que contienen las bandas complejas, si bien introducen distorsiones en la

forma del espectro original, lo que supone una disminución de la relación señal-ruido. Estas técnicas que se llaman de *aumento de resolución*, simplemente facilitan la visualización de las bandas componentes de una banda compleja.

Se impone, por tanto, conseguir una relación señal-ruido lo mayor que sea posible. Esto se puede lograr:

1) Tomando espectros que resulten de promediar un número grande de barridos, ya que la relación señal-ruido mejora de forma directamente proporcional a la raíz cuadrada del número de barridos.

2) Purgando continuamente el compartimento que contiene la muestra con aire seco para eliminar el vapor de agua que produce señales en la zona de la amida I. En el mismo sentido contribuye el uso de un sistema mecánico de lanzadera que permite retirar la muestra del recorrido del haz luminoso y tomar el espectro de referencia sin necesidad de abrir el compartimento, lo que evita la entrada de vapor de agua del ambiente.

3) Manteniendo un buen alineado de todos los componentes ópticos.

4) Eligiendo una adecuada concentración de muestra.

La digitalización de los espectros permite que los datos se encuentren separados por intervalos de frecuencia iguales en números de onda. El algoritmo llamado de “centro de gravedad” permite discriminar cambios de frecuencia con una precisión de menos de 0.1 cm^{-1} . La medida de la anchura de banda se obtiene usando otro algoritmo casi tan preciso como el de la posición de pico y que mide no sólo la anchura a mitad de altura sino también a cualquier fracción de la altura de pico que deseemos (Cameron y Moffatt, 1984). En el mismo sentido la digitalización de los espectros ha facilitado el desarrollo de algoritmos que permiten sustraer espectros, restando de esta forma la contribución del solvente.

1.7.1.- Deconvolución de Fourier.

Cualquier banda de absorción del espectro de infrarrojo se puede expresar como la convolución de un punto del mismo (función delta de Dirac) y de una curva (gaussiana, lorentziana o mezcla de ambas). Esta convolución se puede hacer también en el espacio de Fourier, donde la transformada de la función delta de Dirac, que es una función coseno, y la transformada de una curva lorentziana (una función exponencial decreciente) originan una *función* coseno con caída exponencial. La velocidad de caída de esta exponencial es inversamente proporcional a la anchura de la banda. Si logramos disminuir la velocidad de caída de la exponencial conseguiremos una banda más estrecha. Esto se consigue multiplicando la función coseno por una función exponencial creciente, resultando una nueva función coseno con una caída exponencial más lenta (**figura 2**).

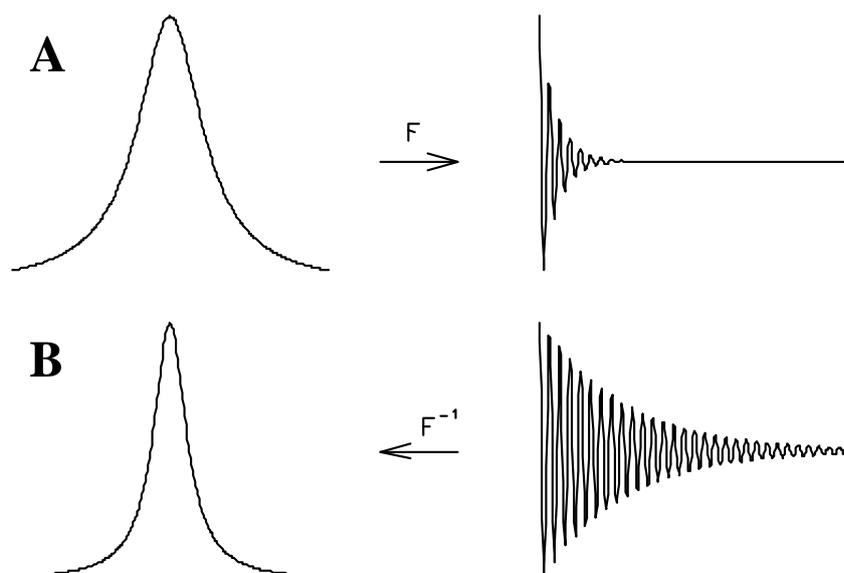


Figura 2 Deconvolución de Fourier. La transformada de una banda ancha es una función coseno con una rápida velocidad de caída exponencial (A). Multiplicando esta función por otra función exponencial creciente se obtiene otra función coseno con menor velocidad de caída exponencial, que en el espacio real dará lugar a una banda más estrecha. Figura tomada de Arrondo et al., 1993.

La relación entre la anchura de la banda original y la de la reducida se denomina parámetro K , o *factor de aumento de resolución*. El espectro real también contiene ruido, por lo que este también crecerá exponencialmente en el proceso de la deconvolución. Así pues, el máximo estrechamiento de banda vendrá limitado por la relación señal-ruido del espectro y por la resolución instrumental. En la práctica el valor máximo que tomemos de K será menor que el logaritmo decimal de la relación señal-ruido (Arrondo et al., 1993). Por último la forma de banda considerada en la deconvolución es Lorentziana.

1.7.2.- Derivada

La derivación es otra herramienta ampliamente utilizada en espectroscopia y que en FT-IR complementa los datos obtenidos en la deconvolución. También se trata de un procedimiento de estrechamiento de banda que se basa en generar derivadas de orden n , y que se puede producir tanto en el espacio real como en el espacio de Fourier (Cameron y Moffatt, 1984). Cuando se realiza en el espacio real tiene lugar en dos etapas: 1) se hace la derivada por convolución de funciones con el espectro, y 2) se aplica un suavizado. El orden de las etapas puede ser alterado e incluso ambas pueden ser integradas en una función de convolución simple. La derivación en el espacio de Fourier optimiza los resultados respecto a la derivación en el espacio real, ya que son

mejores la relación señal-ruido, el estrechamiento de banda y el mantenimiento de la forma de la banda.

El gran problema de la derivación es la rápida disminución de la relación señal-ruido conforme aumenta el orden de la derivada. La derivada en el espacio de Fourier presenta la ventaja de que permite seleccionar el orden óptimo de la derivada para obtener una banda más estrecha, manteniendo la relación señal-ruido lo más grande posible. El algoritmo que se usa produce un grado de derivación intermedio entre el que produciría una 2ª y una 4ª derivada en el espacio real. Así pues, la transformada de Fourier de la derivada *n-ésima* de un espectro resulta ser el producto de la transformada del espectro y una función de compensación. Se trata de una función exponencial comparable a la utilizada en la deconvolución. Por consiguiente, tanto la derivada como la deconvolución resultan de aplicar un tipo determinado de compensación a los datos en el espacio de Fourier.

Los parámetros manejados en la derivación son la potencia de la derivada (pw), que para espectros de infrarrojo suele tener un valor de 3, y el punto de corte (bp), cuyo efecto es reducir el ruido (Cameron y Moffat, 1984).

La deconvolución distorsiona menos el perfil de la banda compleja y conserva las áreas relativas de las bandas componentes, siempre que estas tengan anchuras similares, mientras que la derivada produce una mayor separación de las bandas simples pero distorsiona mucho la banda compleja.

1.7.3.- Eliminación de ruido

La espectroscopia infrarroja puede ofrecernos información cuantitativa sobre la estructura secundaria de proteínas (Arrondo et al., 1993), ya que como se ha dicho la banda amida I es sensible a cambios en la conformación proteica. Los métodos cuantitativos suponen extraer la información de las bandas componentes de la banda compleja amida I, lo que se hace en tres etapas: i) resolución de las bandas componentes (derivación, deconvolución), ii) asignación de cada banda componente a un motivo estructural de la proteína, y iii) ajuste de componentes a la banda amida I. Las soluciones matemáticas a este tipo de ajuste serían infinitas a menos que asumamos unos determinados parámetros iniciales en cuanto a número, posición, anchura y forma de las bandas componentes (Bañuelos et al, 1995).

La posición y el número de bandas componentes se obtiene por deconvolución del espectro original. Ambos parámetros se ven modificados por el ruido presente en el espectro, aunque este no sea visible, introduciéndose artefactos que enmascaran los componentes reales. Se han propuesto diversos métodos para eliminar el ruido de los espectros, como el filtrado de Fourier (Kauppinen et al., 1981) o el suavizado de Savitsky-Golay, que es un método polinomial basado en criterios de mínimos cuadrados

(Savitsky y Golay, 1964). Estos métodos introducen distorsiones de la forma de banda, lo que afecta a la información cuantitativa que contiene la banda amida I de las proteínas (Echabe et al., 1997). Los métodos de eliminación de ruido que suponen la reconstrucción del espectro empleando algoritmos de máxima entropía (DeNoyer y Dodd, 1990) son más eficaces que los dos antes mencionados ya que no modifican la forma de la banda original al eliminar el ruido, permiten distinguir si las bandas son reales o artefactos debidos al ruido presente y disminuyen considerablemente la dispersión de los datos resultantes del proceso para las bandas componentes mayoritarias (Echabe et al., 1997).

2.- *Calorimetría diferencial de barrido (DSC)*

Los barridos de DSC o termogramas registran la diferencia de flujo de calor entre la muestra y una referencia en función de la temperatura. Inicialmente las temperaturas de ambas aumentan linealmente con el tiempo según la velocidad de calentamiento escogida. La diferencia de temperatura entre la muestra y la referencia es cero y el termograma es plano. En el valor de la transición de fase es necesario aplicar más (o menos) calor a la muestra para conseguir el mismo aumento de temperatura que en la referencia. Este exceso se observa como un pico en el termograma: positivo si la transición es endotérmica o negativo si es exotérmica. Cuando se ha completado la transición de fase se recupera la línea de base, aunque en ocasiones el calor específico de la nueva muestra es distinto en el nuevo estado y la nueva línea de base es diferente a la inicial. Las transiciones más comunes y mejor observadas en los sistemas biológicos son los que tiene lugar entre una fase lipídica muy ordenada (gel) y una fase menos ordenada (líquido cristalino) o en el caso de una proteína, entre su conformación nativa y desnaturalizada. La entalpía de esta transición es del orden de kcal/mol.

La información que podemos obtener de un termograma es variada y se resume en la **figura 3**:

a) La transición de fase es un proceso continuo que ocurre en un determinado intervalo de temperatura. La temperatura de transición (T_s) es aquella a la que comienza la transición de fase. La T_m es la temperatura de máxima capacidad calorífica.

b) El área del pico de la transición representa la entalpía (ΔH). Para una transición reversible de dos estados de primer orden, la variación de la energía libre (ΔG) es nula en la T_m ; y la entropía (ΔS) se calcula a partir de:

$$\Delta S = \Delta H/T_m$$

c) La anchura del perfil de la transición de fase ($\Delta T_{1/2}$) y la velocidad de la variación del exceso de entalpía en la T_m , están relacionadas con la cooperatividad o

tamaño de la unidad cooperativa ($N = \Delta H_{VH} / \Delta H_{cal}$). La entalpía de van't Hoff del cambio de fase, para un proceso de dos pasos discontinuo de primer orden, viene dado por la relación:

$$\Delta H_{VH} \approx 6.96 * T_m^2 / \Delta T_{1/2}$$

La unidad cooperativa es una medida del grado de cooperatividad entre las moléculas que experimentan la transición de fase. Para una transición de primer orden completamente cooperativa de una sustancia pura su valor es ∞ , mientras que si el proceso no es cooperativo vale 1. Cualitativamente, cuanto más estrecha y alta sea la endoterma de transición de fase, más cooperativa es ésta.

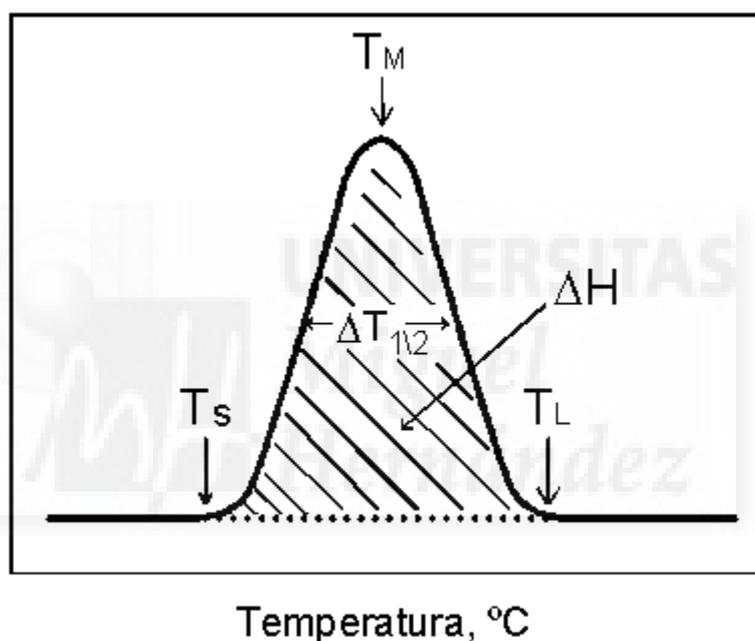


Figura 3. Variación del exceso de calor específico con la temperatura durante un proceso endotérmico. En la figura se especifican los diferentes parámetros que podemos obtener de la misma.

3.- Anisotropía de Fluorescencia.

Cuando se excita a un fluoróforo con luz polarizada, en muchos casos, la emisión de fluorescencia estará también polarizada. Este fenómeno resulta de la existencia de momentos de transición en la absorción y en la emisión, con orientaciones específicas respecto a la estructura del fluoróforo. Si tenemos a los fluoróforos orientados aleatoriamente, y son excitados con luz polarizada, las moléculas cuyo momento de transición se encuentre orientado paralelo al vector eléctrico de radiación incidente, serán preferentemente excitadas. Así, para un fluoróforo dado, las medidas de polarización o anisotropía miden el desfase angular entre la absorción y la emisión (Valeur y Weber, 1977). Este desfase dependerá de la difusión

rotacional durante el tiempo de vida del estado excitado, que por su parte, depende de la viscosidad del solvente y del tamaño, forma y flexibilidad de la molécula (Lakowicz, 1983, 1999).

La polarización o anisotropía de fluorescencia tiene como base la medida de la intensidad de fluorescencia de la luz emitida por la molécula a estudiar a través de un polarizador colocado paralelo o perpendicular al polarizador por el que pasa la luz que excita dicha molécula. (**figura 4**). Las intensidades de fluorescencia medidas pueden ser representadas por I_{vv} y I_{vh} , donde v y h se refieren a las orientaciones vertical u horizontal de los polarizadores, correspondiendo la primera letra a la posición del polarizador de excitación y la segunda al de emisión.

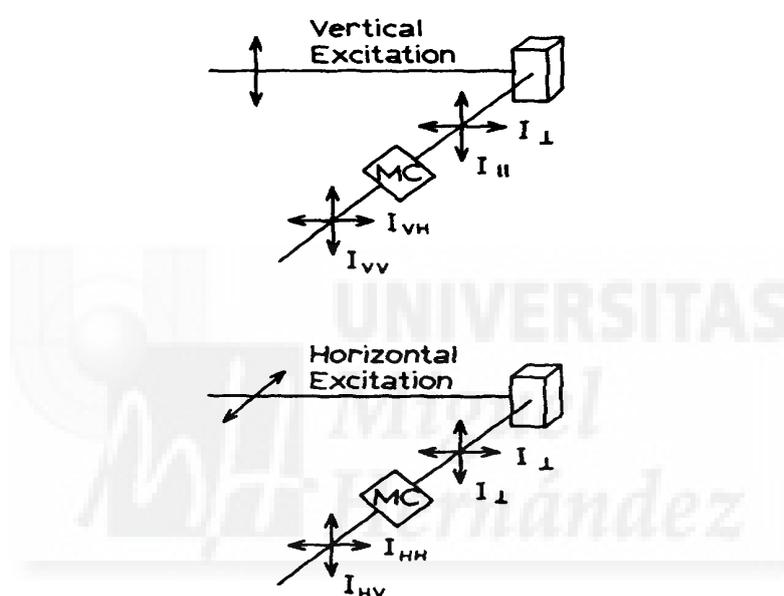


Figura 4. Diagrama esquemático de la medida de anisotropía de fluorescencia en formato L. La posición de los polarizadores situados antes y después de la muestra determinan que la luz de excitación y emisión respectivamente esté polarizada vertical u horizontalmente. MC, monocromador. Figura tomada de Lakowicz, 1999.

La anisotropía de fluorescencia puede ser calculada mediante la ecuación,

$$r = (I_{vv} - I_{vh}) / (I_{vv} + 2I_{vh})$$

En la mayoría de los equipos de espectroscopia de fluorescencia, la determinación de la anisotropía necesita ser corregida debido a las diferentes sensibilidades de los monocromadores o detectores para las radiaciones de polarización vertical u horizontal. La corrección se lleva a cabo recurriendo al uso del factor G, definido como la razón entre las sensibilidades del sistema de detección para la luz de polarización vertical y la sensibilidad para la de polarización horizontal. Este factor se

obtiene midiendo las intensidades de fluorescencia con polarización horizontal de excitación a través de la expresión:

$$G = I_{HV} / I_{HH}$$

La anisotropía, teniendo en cuenta esta corrección instrumental, quedaría así,

$$r = (I_{VV} - GI_{VH}) / (I_{VV} + 2GI_{VH})$$

Esta técnica, tanto en estado estacionario como resuelta en el tiempo, es de gran utilidad en el estudio de diversos procesos biológicos, como son las interacciones de macromoléculas, estudio de sistemas modelo de membrana, interacciones lípido-proteína, etc.

Puesto que la anisotropía de fluorescencia depende entre otros factores de la viscosidad del medio donde se encuentra la molécula, se ha utilizado ampliamente en bioquímica para medir la fluidez de membranas biológicas y sistemas modelo de membrana y cómo ésta se ve alterada por la adición de diferentes compuestos, ya sean lípidos, proteínas o sustancias extrínsecas a las membranas. La temperatura también es otro factor que varía la fluidez de una membrana, sobre todo cuando ésta sufre un cambio de fase. En ese momento se produce un reordenamiento cooperativo de los lípidos que componen la membrana que afecta de manera dramática a la fluidez de la membrana, por lo que una sonda fluorescente que se encuentre embebida en la misma, sufrirá también un cambio cooperativo de anisotropía con la temperatura que será detectable. El cambio de fase con la temperatura más común en los lípidos es aquel en que se pasa de una fase gel, en la que las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos están ordenadas, a fase líquido-cristalino, en la que dichas cadenas se encuentran más desordenadas. En términos de anisotropía, este cambio de fase supone una disminución de la misma con la temperatura (**figura 5**). Del ajuste de los datos experimentales a una sigmoide podemos obtener el valor de la Tm del proceso.

Esta técnica, supone una alternativa a la calorimetría diferencial de barrido en cuanto a la detección de cambios de fase de lípidos, si bien en ambas se puede obtener información diferente. Así, en la anisotropía podemos obtener datos de la fluidez del sistema antes y después de la transición, mientras que en calorimetría se pueden obtener datos cuantitativos de la energía y cooperatividad del proceso.

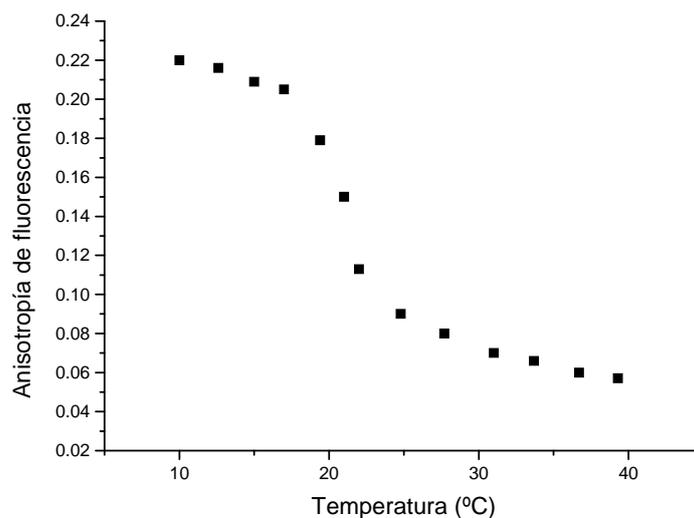


Figura 5. Transición de fase medida por anisotropía de fluorescencia. Los datos corresponden a la anisotropía de fluorescencia de la sonda DPH en vesículas multilamelares del fosfolípido sintético DMPC.

4.- Polarización generalizada de fluorescencia.

La sonda fluorescente laurdan (6-dodecanoil-2-dimetilaminonaftaleno) ha sido caracterizada en diferentes trabajos por Parassisi y colaboradores. Es una sonda que introducida en una membrana, posee una gran sensibilidad espectral a la fase en que se encuentra dicha membrana. El origen físico de las propiedades espectrales del laurdan reside en su sensibilidad a la polaridad y a la dinámica molecular de los dipolos a su alrededor, debido al efecto de los procesos de relajación de dichos dipolos (Parassisi et al., 1990, 1991).

Las propiedades espectroscópicas del laurdan han sido integradas en un parámetro llamado polarización generalizada (GP), introducido por Gratton y colaboradores (Parassisi et al., 1990, 1991). Los valores característicos de GP en fases gel y líquido-cristalino han sido ya determinadas. Así, cuando esta sonda está en un medio en el que puede relajarse a una velocidad comparable o mayor que la velocidad de caída de fluorescencia, como la fase líquido-cristalino de un fosfolípido, la excitación en la parte de mayor longitud de onda (rojo) de la banda de absorción fotoselecciona moléculas de laurdan que ya se han relajado. El espectro de emisión está dominado por la banda roja. Excitando a baja longitud de onda (azul), las moléculas de laurdan se relajan durante su tiempo de vida en el estado excitado, emitiendo predominantemente en la zona azul con valores altos de GP. Además, la propiedad de aditividad de este parámetro puede ser usada para cuantificar la proporción relativa de fases coexistentes. Asimismo, las medidas de GP a más de una longitud de onda de excitación o emisión pueden ayudar a determinar si dominios de diferente composición

y propiedades de fase, coexisten en una membrana (Parasassi et al., 1993). En sistemas con sólo una fase líquido-cristalino el valor de exGP disminuye al mover la longitud de onda hacia el rojo, y permanece inalterado en una fase gel. Sin embargo, si coexisten dos fases, hay un incremento en el valor de exGP. Cuando hay un alto porcentaje de colesterol (30% o más), esta tendencia se invierte aunque haya dos fases, teniendo un comportamiento similar al de la fase líquido cristalino, pero con valores absolutos mayores (Parasassi et al., 1990). En este sentido Castuma et al., 1991, señalan que el enriquecimiento en colesterol de una membrana incrementa la movilidad y disminuye el orden de los lípidos asociados a una proteína de membrana, mientras que disminuye la movilidad e incrementa el orden del resto de los lípidos. Se habla entonces de una fase líquido-ordenada, con propiedades intermedias entre la tipo gel y líquido-cristalino.

5.- Transferencia de Energía por Resonancia.

La transferencia de energía por resonancia es una técnica muy utilizada para dilucidar aspectos estructurales y dinámicos de las macromoléculas (Lakowicz, 1999), ya que puede obtenerse información de distancias del orden de 10 a 100 Å, ideales para estudiar muchos sistemas biológicos. Este fenómeno físico fue observado originariamente por Perrin a principios del siglo XX, pero fue Förster quien propuso una teoría describiendo interacciones moleculares por transferencia de energía de resonancia a finales de los años 40 y que derivaron en la ecuación de velocidad de transferencia que relaciona la distancia intercromófora y las propiedades espectroscópicas de los cromóforos.

Algunos de los aspectos importantes de esta técnica son: i) puesto que la medida se basa en una detección de fluorescencia, hay una gran sensibilidad, ii) se puede obtener información estructural, aunque a baja resolución, independientemente de la complejidad o heterogeneidad del sistema, iii) puesto que la escala de tiempo de la transferencia de energía por resonancia es del orden de nanosegundos, muchos procesos que son promediados por otras técnicas pueden ser resueltos, como son la conversión lenta de confómeros. Además, el uso de esta técnica no tiene porqué limitarse a los espectrofotómetros convencionales, sino que puede aplicarse en ensayos de cromatografía líquida, electroforesis, microscopía, detecciones *in vivo*, citometría de flujo, etc.

La eficiencia de la transferencia de energía por resonancia (E) en relación a todo el resto de procesos de desactivación del donador excitado depende de la sexta potencia de las distancias entre donador y aceptor. De acuerdo con la teoría de Förster (Förster, 1948), E viene dada por

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6)$$

donde r es la distancia intermolecular y R_0 , radio de Förster, es un parámetro constante para cada par donador-aceptor, definido como la distancia a la que E es 50%. R_0 puede calcularse con la ecuación,

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2\Phi_D J}{128\pi^5 n^4 N_{AV}}$$

donde n es el índice de refracción del medio, Φ_D es el rendimiento cuántico de fluorescencia del donador en ausencia del aceptor, J es la integral de solapamiento espectral y κ^2 es el factor de orientación entre los momentos de transición del donador y aceptor. Normalmente se usa un valor de κ^2 de 2/3, lo que sólo es estrictamente válido para sistemas con una distribución isotrópica en tres dimensiones de donadores, y con algunas limitaciones a una distribución tridimensional de donadores y una distribución bidimensional (en un plano) de aceptores. Sin embargo, el variar el valor de este parámetro conlleva una gran complejidad en el cálculo que al final sólo supone unas ligeras variaciones en el resultado final. En cuanto al valor de J, viene dado por

$$J = \frac{\int f_D(\lambda)\varepsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda}{\int f_D(\lambda)d\lambda} \quad (\text{M}^{-1}\text{cm}^3)$$

donde $f_D(\lambda)$ es la intensidad de fluorescencia del donador a cada longitud de onda y $\varepsilon(\lambda)$ es el coeficiente de extinción molar del aceptor a cada longitud de onda.

5.1.- Análisis de los datos de Transferencia de Energía por Resonancia.

El análisis de los datos de transferencia de energía por resonancia en sistemas bidimensionales como son las membranas biológicas, necesitan de la aplicación de un modelo que tenga en cuenta todos los posibles pares de donador-aceptor que se puedan dar en estos sistemas tan complejos. En este sentido, el modelo de Gutiérrez-Merino (Gutiérrez-Merino et al. 1987, 1994, 1995) es ideal para su aplicación en proteínas de

membranas como el AcChR en el que la sonda donadora está situada en la misma proteína y la aceptora se encuentra distribuida en una estructura bidimensional como es la membrana lipídica alrededor del receptor. Este modelo asume que la velocidad de transferencia de energía del sistema (k_T) es equivalente a la suma de la transferencia de energía que ocurre entre los pares individuales donador-aceptor en un sistema de membrana bidimensional (la bicapa lipídica), es decir, que $k_T = \sum k_i$, donde la velocidad de transferencia de energía para el par i separado por una distancia r_i es k_i , suponiendo que la velocidad de translación del donador y aceptor es mucho más lenta que el tiempo de vida media del estado excitado del donador.

Entonces la transferencia de energía puede escribirse como,

$$\langle E \rangle = k_T / k_o + k_T$$

donde k_o es el valor de la constante de velocidad media de la transferencia de energía para un par donador-aceptor separado por la distancia R_o , es decir, la distancia a la cual la eficiencia de transferencia de energía es 50%.

En la aproximación analítica desarrollada por Gutiérrez-Merino (Gutiérrez-Merino et al. 1987, 1994, 1995) el donador y el aceptor en la membrana serían un continuo de discos de diferentes tamaños, geometría que permite calcular todos los posibles pares donadores-aceptores que contribuyan a la transferencia de energía a una distancia dada r_i . Por ese motivo se asume que los residuos de triptófano se encuentran en un anillo dentro del perímetro de la zona transmembrana del AcChR, que tiene un radio externo de 32.5 Å (Unwin, 1993). Los residuos de triptófano en el AcChR pueden experimentar homotransferencia de energía entre ellos mismos (de ahí su baja anisotropía y bajo rendimiento cuántico medio) y se suponen formando una red en la estructura tridimensional del AcChR. La altura del plano de los residuos de triptófano en esta proteína con respecto al plano de los aceptores, se define mediante el parámetro **H** (figura 6). Asimismo, las moléculas de AcChR se toman como cilindros distribuidos en una matriz triangular regular en la bicapa, basándose en el máximo empaquetamiento de las partículas de AcChR vistas por Unwin (Unwin, 1993). En este esquema, cada molécula de AcChR estaría rodeada por un cinturón de moléculas de lípido de 10 Å cada uno. Este modelo también tiene en cuenta el área no accesible a moléculas aceptoras debido a la perturbación introducida por moléculas vecinas de AcChR. La distancia r entre el donador y aceptor, ha sido tomada como la mínima distancia entre el par donador-aceptor en este sistema.

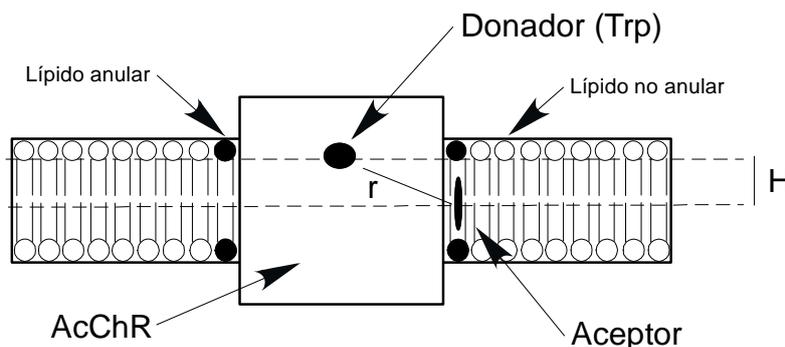


Figura 6. Esquema considerado para los cálculos de transferencia de energía. Se ha representado el AcChR en membrana lipídica, colocando de manera arbitraria la posición de la sonda aceptora de fluorescencia y del triptófano donador de fluorescencia. Realmente hay muchos más triptófanos en la proteína, pero se ha colocado solamente uno para mayor claridad. La mínima distancia entre donador y aceptor es “r”, mientras que la distancia entre los planos en que se encuentran el donador y el aceptor es “H”. También se señalan en el esquema los lípidos anulares y los no anulares.

Por último el modelo permite calcular la distribución del aceptor alrededor del donador, determinando si ésta es al azar o si hay alguna preferencia entre esas dos moléculas. Para ello se sigue el siguiente razonamiento: la probabilidad (α) de ocupación de los sitios en la región anular de la proteína por un aceptor (L_1) en relación con la de una molécula de lípido no fluorescente ha sido calculada a partir de su constante de disociación en relación a la constante de disociación media de los lípidos sin marcar en la bicapa (L_2).

Así, usando los equilibrios,

$$P + L_1 \approx PL_1 \quad \text{con } K_1 \text{ como constante de disociación}$$

$$P + L_2 \approx PL_2 \quad \text{con } K_2 \text{ como constante de disociación}$$

y expresando la concentración de L_1 y L_2 como fracciones molares, x_1 y x_2 respectivamente, obtenemos que

$$\alpha = (x_1 / K_1) / (x_2 / K_2) = (x_1 / x_2) * K_r^{-1}$$

donde $x_1 + x_2 = 1$ y donde K_r es la constante aparente de disociación del aceptor por la región anular lipídica.

Los valores de eficiencia de transferencia de energía para diferentes densidades superficiales de aceptor se pueden calcular en función de los parámetros r , H y K_r , obteniéndose así curvas teóricas que luego podrán ser comparadas con los datos experimentales para así obtener estos tres parámetros. En el caso de obtener un K_r igual a uno para un aceptor, la probabilidad de ocupación de cada sitio anular es $\alpha = x_1 / x_2$,

como es de esperar para una distribución al azar de una sonda en una bicapa. En este caso hay las mismas probabilidades de que el receptor esté ocupando un sitio en la región anular como en cualquier otro sitio, por lo que distribución es al azar en la membrana. Sin embargo, un $K_r < 1$ significa una localización preferente del receptor en el anillo lipídico y un $K_r > 1$ una exclusión de esa región.

6.- Obtención de parámetros cinéticos de la actividad del AcChR.

En la obtención de parámetros cinéticos asociados a la actividad del AcChR se utiliza el apagamiento de fluorescencia de un fluoróforo atrapado en las vesículas donde se encuentra la proteína (ver *Materiales y Métodos*), por medio de un catión que entra en la vesícula a través del canal que forma la proteína una vez se ha unido a su agonista. La rápida entrada de estos cationes en los liposomas que contienen el AcChR es un proceso de primer orden para experimentos de activación llevados a cabo en un intervalo inferior a 300 ms. Combinando la ecuación de velocidad de primer orden con la ecuación de Stern-Volmer de apagamiento de fluorescencia (ecuaciones 1 y 2), se puede calcular la constante de velocidad de flujo iónico a partir de la pérdida de intensidad de fluorescencia. Como paso previo a la obtención de estos parámetros, hay que hallar cual es la constante que rige el proceso de apagamiento dinámico del fluoróforo por parte del catión.

Del ajuste de los datos de la intensidad de fluorescencia del fluoróforo frente a la concentración del catión a la ecuación de Stern-Volmer para la extinción dinámica de la fluorescencia,

$$F / F_0 = 1 / (1 + KM)$$

donde F y F_0 representan la fluorescencia en presencia y ausencia del catión, M es la concentración del catión, se obtiene K, la constante de Stern-Volmer.

Cuando vesículas lipídicas conteniendo el fluoróforo se mezclan con tampón que incorpora el catión en un instrumento de flujo detenido, se observa una caída lenta de fluorescencia. Esta caída representa el apagamiento de la fluorescencia del fluoróforo interno, debida a la entrada no selectiva del catión a través de la membrana. Sin embargo, la adición de concentraciones crecientes de agonistas, que provocan la apertura del canal incluido en las mismas vesículas, resulta en una entrada más rápida del catión al interior de las vesículas, que se superpone al flujo iónico debido a la permeación pasiva, y que es resultado de la apertura del canal iónico asociado al AcChR como consecuencia de la unión del agonista (**figura 7**). Por esa razón hay que distinguir esos dos procesos, que tendrán sus constantes de velocidad correspondientes.

Con ese objetivo, las trazas de datos obtenidas mediante “stopped-flow”, tal y como se especifica en *Materiales y Métodos*, se ajustan a las ecuaciones (1) y (2) según el método de regresión no lineal del paquete comercial de tratamiento de datos Sigma Plot V.4.1 que utiliza el algoritmo de Marquardt-Levenberg.

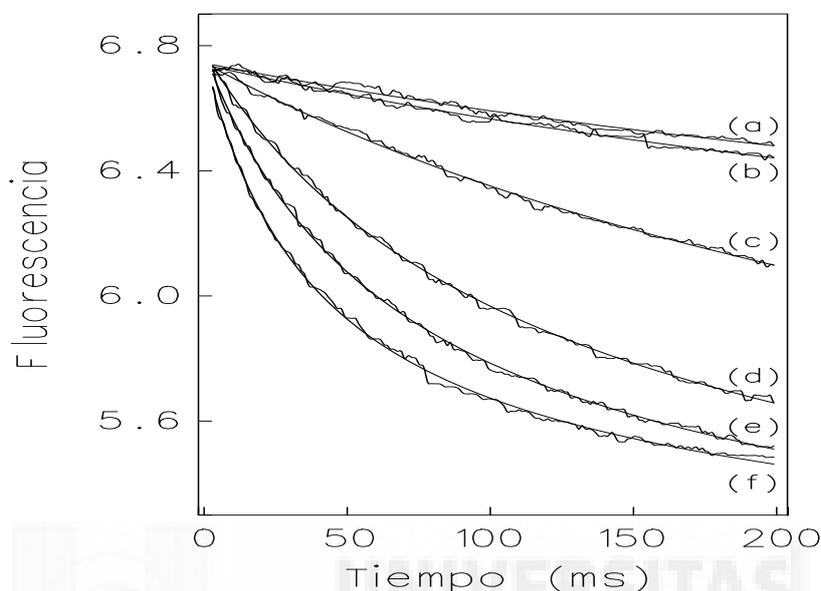


Figura 7. Cinética del flujo de Tl^+ inducido por agonista. En la figura se muestra la extinción de fluorescencia del PTSA encapsulado en vesículas de asolectina completa conteniendo AcChR purificado. Las distintas trazas representan el flujo inespecífico (a) y el inducido por 25 (b), 50 (c), 100 (d), 150 (e) y 200 μM (f) de carbamilcolina (concentración final). Las líneas continuas se corresponden con el ajuste de cada traza experimental a las ecuaciones (1) y (2) especificadas en este apartado.

El ajuste de las trazas, proporciona el valor de las constantes aparentes de velocidad (k_{app}) del proceso de apagamiento de fluorescencia del fluoróforo por el catión. La primera ecuación se aplica a trazas de flujo pasivo, sin agonista, y una vez obtenidos los datos del ajuste, se utilizan para hallar la constante de velocidad del proceso activo que nos da información de la actividad del canal, en este caso el AcChR. En ambos casos se incluye como parámetro conocido la constante de Stern-Volmer obtenida anteriormente.

$$F = F_o + \frac{F_1}{1 + KQ(1 - e^{-k_1 t})} \quad \text{Ecuación (1)}$$

$$F = F_o + \frac{F_1}{1 + KQ(1 - e^{-k_1 t})} + \frac{F_2}{1 + KQ(1 - e^{-k_2 t})} \quad \text{Ecuación (2)}$$

F_o = Fluorescencia a tiempo 0.

K = constante de Stern-Volmer.

Q = concentración máxima de iones Tl^+ .

k_1 y k_2 = constantes de velocidad aparente.

La dependencia de k_{app} con la concentración de agonistas para el AcChR reconstituido en vesículas lipídicas se ajusta a la ecuación (3):

$$k_{app} = \frac{k_{app}^{max} L^2}{(L + K_D)^{n_H}} \quad \text{Ecuación (3)}$$

L = concentración de agonista

Si $n_H = 2$ y se reordena la ecuación, se obtiene:

$$\frac{1}{\sqrt{k_{app}}} = \frac{1}{\sqrt{k_{app}^{max}}} + \frac{1}{L} \frac{K_D}{\sqrt{k_{app}^{max}}} \quad \text{Ecuación (4)}$$

de la que se puede obtener a partir de la representación de $(k_{app})^{(-1/2)}$ vs $(1/L)$, los valores de K_D y k_{app}^{max} .