

# Un modelo estructural por homología del dominio TM4 del neurorreceptor GABA $\rho$ 1 humano



Entidad Académica, Instituto de Neurobiología  
Universidad Nacional Autónoma de México

TESIS QUE PARA OBTENER EL  
**GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
PRESENTA

Argel Raúl Estrada Mondragón

DIRECTOR DE TESIS:

**Dr. Ataúlfo Martínez Torres**

*Campus Juriquilla, Querétaro*



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

A todos ustedes, personas importantes, familia y amigos que siguen estando allí acompañándome en este excitante camino.

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
<b>GENERALIDADES DEL RECEPTOR GABA<sub>A</sub></b>	<b>5</b>
<b>PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS DE LOS RECEPTORES GABA<sub>ρ</sub></b>	<b>6</b>
<b>ESTRUCTURA CUATERNARIA DE LOS RECEPTORES PENTAMÉRICOS ACTIVADOS POR LIGANDO</b>	<b>11</b>
DOMINIO DE UNIÓN A LIGANDO	14
ASA C	16
“CYS-LOOP”	17
ASA β8-β9	18
DOMINIO TRANSMEMBRANAL TM2 (REGIÓN DE PORO)	18
COMPUERTA EN EL CANAL	19
FILTRO DE SELECTIVIDAD	20
DOMINIO TRANSMEMBRANAL TM4	22
ASA INTRACELULAR TM3-TM4 (DOMINIO ACCESORIO MA)	24
<b>MECANISMO DE ACTIVACIÓN</b>	<b>25</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>27</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>27</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>27</b>
<b>METODOLOGÍA</b>	<b>27</b>
GENERACIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA	27
GENERACIÓN DE UN ARCHIVO PDB	28
GENERACIÓN DEL PENTÁMERO	28
REFINAMIENTO, VALIDACIÓN, Y REPRESENTACIÓN TRIDIMENSIONAL DEL MODELO	28
<b>RESULTADOS</b>	<b>31</b>
ALINEAMIENTOS.	31
GENERALIDADES DE LA ESTRUCTURA CUATERNARIA.	32
DOMINIO DE UNIÓN A LIGANDO.	33
ASA C	34
“CYS-LOOP”	35
ASA β8-β9	35
DOMINIO TRANSMEMBRANAL TM2 (REGIÓN DEL PORO)	36
COMPUERTA	38
FILTRO DE SELECTIVIDAD	39
DOMINIO TRANSMEMBRANAL TM4	40
ASA INTRACELULAR TM3-TM4 (DOMINIO ACCESORIO MA)	42
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>43</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>55</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>55</b>

## Introducción

Los canales iónicos activados por ligando (LGIC) son proteínas integrales de la membrana plasmática que forman un poro, el cual permite el flujo regulado de distintos iones a través de la misma (Numa, 1987; Grenningloh et al., 1987; Schofield et al., 1987; Hucho y Hilgenfeld 1989; Cockcroft et al., 1990; Le Novère y Changeux 1999). Los canales se abren debido a la unión de un neurotransmisor que desencadena un cambio conformacional que termina por favorecer un estado de conducción. Estas proteínas median la transmisión sináptica rápida (Yakel y Jackson, 1988), en una escala de tiempo de milisegundos, tanto en el sistema nervioso como en la unión neuromuscular (Albuquerque y Oliveira, 1979), aunque la expresión de algunas de estas proteínas en las células no excitables sugiere además posibles funciones adicionales.

Por convención se clasifica a estos canales de acuerdo a su selectividad iónica como aquellos que son selectivos a cationes, tal es el caso del receptor nACh (nicotínico acetilcolinérgico) (Millar y Gotti, 2009), 5-HT<sub>3</sub> (serotoninérgico) (Barnes et al., 2009), receptores ionotrópicos de glutamato (Lodge, 2009), y receptores P2X (Jarvis y Khakh, 2009), y por otra parte, aquellos que seleccionan aniones, como el receptor GABA<sub>A</sub> (Olsen y Sieghart, 2008), y los receptores de glicina (Lynch, 2009). De estos últimos, el nACh, 5-HT<sub>3</sub>, GABA<sub>A</sub>, y los receptores de glicina (así como un canal adicional activado por Zn<sup>2+</sup>; Davies et al., 2003), conforman estructuras pentaméricas y son denominados frecuentemente como receptores “Cys-loop” debido a la presencia de un asa formada por una serie de residuos separados por un puente disulfuro constituido por dos cisteínas en el dominio extracelular de sus subunidades constitutivas. No obstante, los ancestros procariotas de estos receptores, aunque preservan un consenso de los residuos que forman este dominio carecen de las cisteínas y por tal razón el término canales iónicos pentaméricos activados por ligando (pLGIC) comienza a ganar aceptación dentro de la literatura (Hilf y Dutzler, 2009).

Debido a la complejidad para expresar y determinar la estructura molecular de estas proteínas se han realizado una serie de estudios exhaustivos buscando una buena resolución ultraestructural, tanto con el receptor nACh (Unwin, 2005), así como con quimeras de las fracciones solubles, o bien de proteínas homólogas como la proteína de unión a acetilcolina (AChBP, Brejc et al., 2001) o receptores homólogos de bacterias (ELIC y GLIC; Hilf y Dutzler, 2008; 2009; Bocquet et al., 2009). Aunque se conoce con gran precisión la estructura de algunas de estas proteínas las cuales sugieren una enorme y conservada correspondencia constitutiva u homología entre todos los miembros de la familia, las complejas funciones específicas en las que están involucradas, así como los mecanismos puntuales que ocurren mediando su activación e inactivación siguen siendo actualmente motivo de estudio (Taly et al., 2009; Yang et al., 2009; Zouridakis et al., 2009).

Muchos de estos estudios también tienen como objetivo la identificación de moléculas capaces de activar, inactivar, bloquear o modular eficientemente la respuesta de las proteínas antes mencionadas en condiciones fisiológicas normales (Friis et al., 2009; Kasheverov et al., 2009), o bien en algunas enfermedades relevantes tanto neurológicas como de otra etiología, y donde éstas pueden estar además vinculadas (DeSimone et al., 2004; Steinlein, 2007; Steinlein y Bertrand, 2008; Piao et al., 2009; Rahman et al., 2008; Reid et al., 2009; Vernino et al., 2009). Considerando los avances logrados en el descubrimiento de drogas mediante ensayo y error; si se conoce la estructura del dominio principal involucrado en el reconocimiento del ligando específico, o aquellos dominios alostéricos capaces de modular la conducción iónica, se puede llegar a realizar un verdadero diseño racional de fármacos (Hogg et al., 2007; López-Vera et al., 2007;

Maskos, 2007; Mudo et al., 2007; Romanelli et al., 2007; Taylor et al., 2007; Changeux y Taly, 2008; D'hoedt et al., 2009; Gotti et al., 2009; Lape et al., 2008; Sharma y Vijayaraghavan, 2008).

Uno de los neuroreceptores más estudiado farmacológicamente por su relevancia en funciones asociadas al sistema nervioso es el receptor GABA<sub>A</sub>, el cual se sabe además tiene una participación en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Alzheimer y la epilepsia (Nicholson et al., 1995; Mizukami et al., 1998; Cope et al., 2009; Möhler, 2009; Moulton, 2009). El enfoque de este proyecto consiste en identificar algunos de los principales dominios alostéricos que modulan la función de este tipo de receptores.

## Generalidades del Receptor GABA<sub>A</sub>

El receptor GABA<sub>A</sub> está conformado por un pentámero de distintas subunidades, éstas pueden ser una combinación heteromérica de  $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-3}$ ,  $\gamma_{1-3}$ ,  $\delta$ ,  $\rho_{1-3}$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$  y  $\theta$ , u homomérica de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\rho$ , en mamíferos (Korpi et al., 2002; Whiting, 2003; Sieghart, 2006; Olsen y Sieghart, 2008; 2009). La subunidad  $\pi$  hasta el momento sólo se ha identificado en células germinales (Hedblom y Kirkness, 1997). Muchos subtipos del receptor GABA<sub>A</sub> contienen a las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  en una combinación estequiométrica común, típicamente  $2\alpha.2\beta.1\gamma$  (Korpi et al., 2002; Fritschy y Brünig, 2003), el hetero-oligómero  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ , por ejemplo constituye la población más alta de receptores GABA<sub>A</sub> en todo el SNC, seguido por las isoformas  $\alpha_2\beta_3\gamma_2$  y  $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ . Los receptores que incorporan a las subunidades  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$ ,  $\beta_1$ ,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_3$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\theta$  son mucho menos numerosos, sin embargo pueden tener funciones muy importantes; por ejemplo, algunos receptores extrasinápticos que contienen una combinación de las subunidades  $\alpha_6$  y  $\delta$ , en células granulares del cerebelo; o la combinación de  $\alpha_4$  y  $\delta$ , en células granulares del giro dentado, así como neuronas del tálamo median una corriente tónica que no se desensibiliza y que es importante para la excitabilidad neuronal en respuesta a concentraciones mínimas de GABA (Mody y Pearce, 2004; Semyanov et al., 2004; Farrant y Musser, 2005). Se sabe además que la interacción de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  contribuye en la formación del sitio de unión a GABA, y por otra parte la combinación de las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$  es importante en el reconocimiento y eficacia de unión a benzodiazepinas (Mamalaki et al., 1987; Stephenson et al., 1990).

La clasificación actual de receptores GABA<sub>A</sub> ha sido llevada a cabo por un comité designado para la clasificación de drogas y la nomenclatura de receptores de la Unión Internacional de Farmacología básica y clínica, NC-IUPHAR (Barnard et al. 1998; Olsen y Sieghart, 2008). Los criterios y parámetros usados para la clasificación se basan en la estructura de las subunidades, farmacología, y función del receptor. Existe sin embargo un apartado en el que se ha destacado una entidad molecular particular, que fue considerada por algún tiempo de manera independiente a los receptores GABA<sub>A</sub>, debido a su farmacología distintiva que incluye insensibilidad a benzodiazepinas y barbitúricos constituida por receptores homoméricos o heteroméricos de las subunidades  $\rho_{1-3}$ , a los cuales se les llamó receptores GABA<sub>C</sub> (Zhang et al., 2001), actualmente se clasifican como formas de los receptores GABA<sub>A</sub> por la NC-IUPHAR bajo los criterios antes mencionados (Barnard et al., 1998; Olsen y Sieghart, 2008; 2009). Esta propuesta es además fortalecida por la observación de que la mutación de sólo un aminoácido le puede conferir las características típicas comunes en la

modulación farmacológica de los receptores GABA<sub>A</sub> (Belelli et al., 1999; Walters et al., 2000).

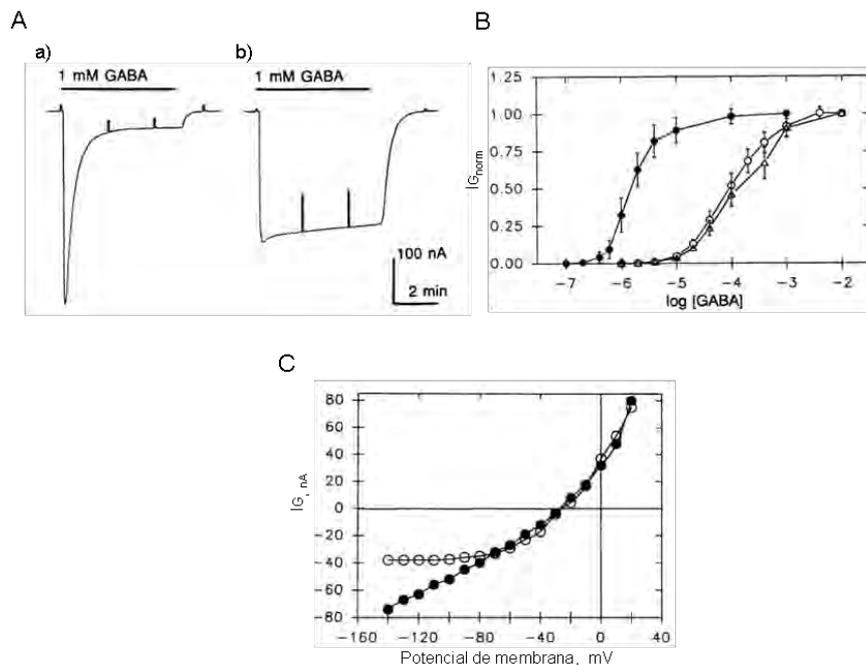
Los GABA<sub>ρ</sub> son expresados de manera abundante en células horizontales y bipolares en la retina de los vertebrados (Enz y Cutting, 1999; Greka et al., 2000; Shields et al., 2000). Aunque se ha probado su participación en la sinapsis (Boller et al., 2001), su localización es mayoritariamente extrasináptica (Ichinose y Lukasiewicz, 2002; Kirischuk et al., 2003; Alakuijala et al., 2006; Hull et al., 2006), y al igual que otras combinaciones de receptores extrasinápticos éstos generan corrientes tónicas que no se desensibilizan. Su tiempo medio de apertura oscila en un rango que va de 150-200 ms lo cual es 5 veces más amplio que cualquier otra combinación del receptor GABA<sub>A</sub> y su dosis media de activación (GABA EC<sub>50</sub>) es de 0.8 a 2.2 μM en receptores recombinantes homoméricos GABA<sub>ρ</sub>1 y GABA<sub>ρ</sub>2; y 7.5 μM en GABA<sub>ρ</sub>3, por lo que es alrededor de cinco veces más sensible que la mayoría de combinaciones GABA<sub>A</sub> heteroméricas (Feigenspan et al., 1993; Amin y Weiss, 1994; Feigenspan y Bormann, 1994). Por muchos años se pensó que su expresión estaba limitada a la retina, sin embargo durante los últimos años se ha acumulado evidencia identificando a estas subunidades ampliamente distribuidas a lo largo de todo el sistema nervioso, tanto central como periférico, el sistema gastrointestinal, cardiovascular, e incluso en el espermatozoide (Boue-Grabot et al., 1998; Wegelius et al., 1998; Enz y Cutting, 1999; Zhu y Lo, 1999; Boller y Schmidt, 2001; Fletcher et al., 2001; Didelon et al., 2002; Rozzo et al., 2002; Didelon et al., 2003; Schlicker et al., 2004; López Chávez et al., 2005; Jost et al., 2006; Gamel-Nakayama et al., 2006; Born y Schmidt, 2006; Rosas-Arellano et al., 2007; Li et al., 2008).

Muchos estudios de diversa índole han utilizado como modelo al receptor GABA<sub>ρ</sub>1, aprovechando varias de sus particularidades como su distintivo ensamble homomérico en sistemas heterólogos, o su peculiar farmacología. Muchos de estos trabajos se han realizado utilizando como sistema de expresión al ovocito de *Xenopus laevis* tomando ventaja de su relativa sencillez, tanto para su caracterización electrofisiológica como farmacológica (Miledi et al., 1982). Algunos de los datos obtenidos a través de estos estudios han sido determinantes en la identificación molecular de dominios funcionales, e incluso residuos aminoacídicos puntuales que han resultado ser críticos para la función de la proteína. Con base en lo anterior, este proyecto será destinado al estudio de dominios alostéricos capaces de modular la función, considerando para ello la posible estructura tridimensional de este receptor.

## Propiedades electrofisiológicas de los receptores GABA<sub>ρ</sub>

El primer reporte conocido de esta familia de receptores proviene de un trabajo original utilizando al ovocito como modelo de expresión heteróloga. En este estudio se inyectó RNAm extraído de retina de bovino y posteriormente, utilizando la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos (Polenzani et al., 1991), se identificó que esta preparación tenía propiedades electrofisiológicas distintas a las respuestas típicas de los receptores GABA<sub>A</sub> obtenidas de preparaciones provenientes de la corteza cerebral. La EC<sub>50</sub> del receptor GABA<sub>A</sub> de retina resultó ser de  $1.48 \pm 0.32$  μM, en contraste con el de corteza de  $84.6 \pm 15.3$  μM; y que a diferencia de ésta no se bloqueaba a concentraciones de 100 μM del antagonista específico bicuculina, utilizado para inhibir la respuesta de los receptores GABA<sub>A</sub> (**Fig. 1B**) (Parker y Miledi, 1986; Barnard et al., 1987; Smart et al., 1987; Parker et al., 1988). La diferencia en la desensibilización fue la característica más evidente de este canal, los receptores generados por la expresión del

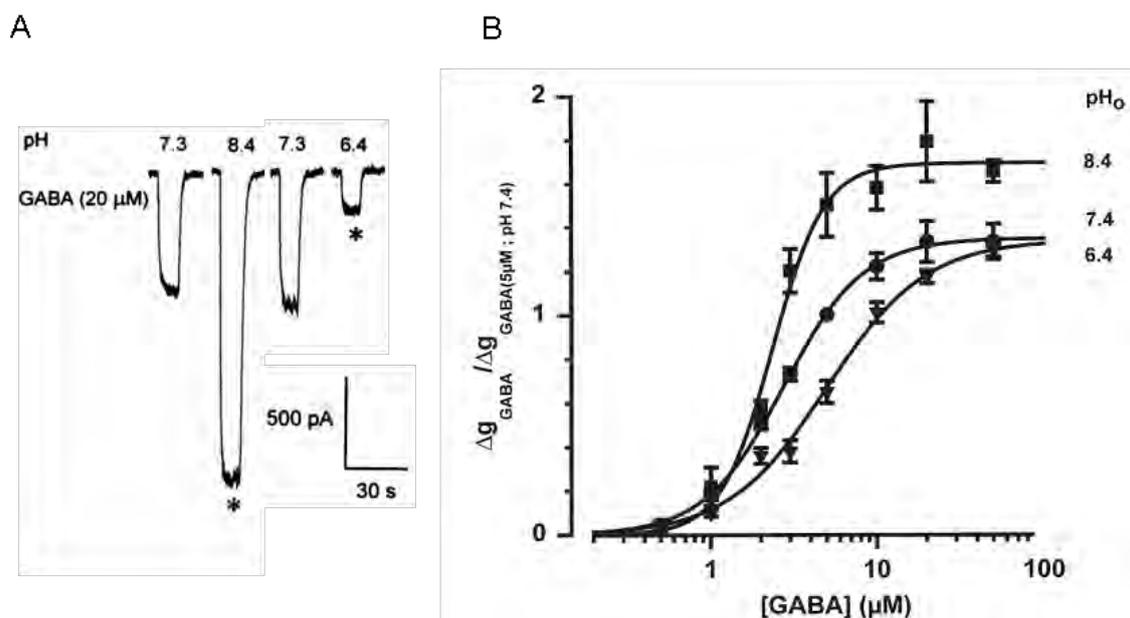
RNA de corteza presentaron una desensibilización característica en la que la respuesta disminuyó al 50 % de la respuesta máxima aproximadamente a los 30 segundos posteriores a la activación, usando una concentración de 1 mM de GABA; y llegando a abolirse más del 90 % después de 4 minutos. Por otra parte, los receptores generados por el RNA de retina sólo presentaron una disminución del 12 % de la corriente máxima después de 4 minutos de exposición a la misma concentración de GABA (1 mM) (**Fig. 1A**) (Polenzani et al., 1991). Este estudio se realizó con un potencial de mantenimiento de -60 mV, y se produjo una corriente entrante (asociada en este caso a la salida de un anión de la célula), y se obtuvo un potencial de inversión en un rango de -20 a -30 mV, que de acuerdo a la ecuación de Nernst coincidió con el potencial de inversión calculado para el ión  $\text{Cl}^-$  en el ovocito ( $-28 \pm 2$  mV) (Kusano et al., 1977; 1982; Dascal, 1987). Se realizó además una curva de corriente vs voltaje, en la que este canal presentó un comportamiento parecido al ohmico, a diferencia de los receptores  $\text{GABA}_A$  típicos, que presentan rectificación saliente a potenciales más negativos que -60 mV (**Fig. 1C**). Para identificar con precisión la especie iónica en tránsito a través del canal se realizaron sustituciones eliminando del baño al ión  $\text{Na}^+$  sustituyéndolo, ya sea con Tris  $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ , o Colina  $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ , o incrementando la concentración del ión  $\text{K}^+$  de 2 a 20 mM sin que presentara un cambio significativo en el potencial de inversión, demostrando así que estos cationes no tienen una participación durante la generación de la corriente. Esto a su vez tampoco se presentó al remover el  $\text{Ca}^{2+}$  de la solución extracelular o bien por la quelación de éste, inyectando EGTA ( $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}$ ) al ovocito (Miledi, 1982; Houamed et al., 1984; Oron et al., 1985; Parker y Miledi, 1986). También, a diferencia de las características típicas de los receptores GABA expresados en la corteza, la expresión del receptor generado a partir del RNA de la retina no presentó una modulación significativa a concentraciones de 1-100  $\mu\text{M}$  del barbiturato pentobarbital, ni de las benzodiazepinas clorazepato a 1-100  $\mu\text{M}$ , o diazepam 1-10  $\mu\text{M}$  (Parker et al., 1988; Sigel y Baur, 1988).



**Fig 1.** Respuestas generadas por el receptor  $\text{GABA}_A$ . A, a) corriente generada por GABA 1 mM en ovocitos inyectados con RNAm de corteza cerebral de bovino, b) corriente generada por GABA 1 mM en ovocitos inyectados con RNAm de retina de bovino. B, curva dosis vs respuesta a GABA generada por la inyección de RNAm en ovocitos proveniente de corteza cerebral de bovino (triángulos), corteza cerebral de rata (círculos claros), y retina de bovino (círculos oscuros). C, Curva I/V de respuestas a GABA generadas en ovocitos por la inyección de RNAm proveniente de corteza cerebral (círculos claros), y retina (círculos oscuros); Polenzani et al., 1991.

A partir de este estudio pionero se identificó posteriormente al gen responsable de las respuestas funcionales particulares, y fue clonado a continuación utilizando para ello oligonucleótidos degenerados, diseñados a partir de la secuencia conservada entre las distintas subunidades del receptor GABA<sub>A</sub>, y glicina, correspondiendo al dominio de poro (segmento transmembranal 2, TM2), y el segmento transmembranal 3 (TM3), a partir de DNAc de una biblioteca de retina humana (Cutting et al., 1991). Al expresar este gen en ovocitos se identificaron las mismas respuestas electrofisiológicas antes mencionadas, demostrando que ésta era en verdad la identidad molecular detrás de ellas e identificando además, que al igual que en las combinaciones típicas de los receptores GABA<sub>A</sub>, éstos también son bloqueados por picrotoxina con una IC<sub>50</sub> de 0.4 μM (Cutting et al., 1991; Shimada et al., 1991).

Por otra parte, se ha estudiado también el papel que juegan distintos moduladores; se sabe por ejemplo que los protones tienen un efecto en la excitabilidad del cerebro (Tombaugh y Samjen, 1996), estos efectos se han estudiado también en el receptor GABA<sub>A</sub>1 y se encontró que la corriente entrante inducida por GABA fue disminuida considerablemente ante la coaplicación de GABA, al mismo tiempo que se modificaba el pH del medio extracelular del valor fisiológico, 7.4 a uno ácido, 6.4 y casi en la misma medida se vio un incremento notable en la magnitud de la corriente cuando se cambió el pH extracelular del valor original de 7.4, a otro alcalino, 8.4. La acidificación disminuyó la corriente total a un 52 ± 5% de su valor original, mientras que la alcalinización la llevó hasta un 124 ± 4% de éste (Fig. 2). El coeficiente de Hill mostró un incremento gradual, en la misma proporción en que incrementaba el pH, fue de 1.4 ± 0.16 a pH de 6.4, 1.8 ± 0.07 a pH de 7.4, y 2.8 ± 0.40 a pH de 8.4. Esto indica que los protones inducen un desacoplamiento del efecto alostérico generado por la asociación del ligando vinculado con su sitio de unión. Es decir, visto a gran escala ocurre una disminución en la cooperatividad inducida por protones, durante el mecanismo de activación del receptor ante la unión de GABA (Huang et al., 1999; Rivera et al., 2000; Qian et al., 2006).



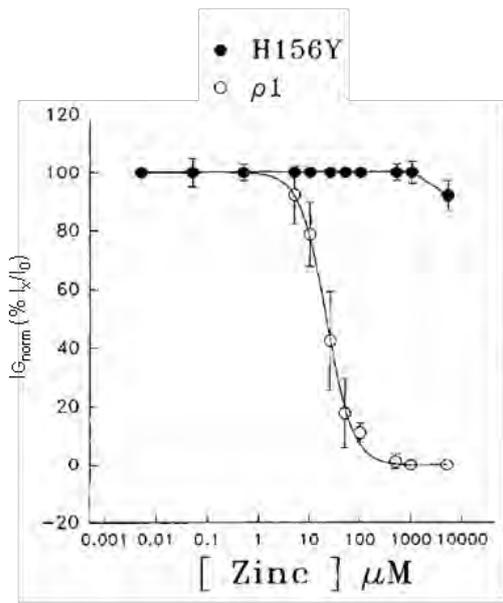
**Fig 2.** Modulación de la respuesta de GABA ante cambios en el pH. A, efecto del pH sobre las corrientes generadas por la aplicación de GABA 20 μM en células HEK-293 transfectadas con DNAc de GABA<sub>A</sub>1 humano. B, curva dosis vs respuesta a GABA modulada por la actividad del pH extracelular ácido (6.4) triángulos, o alcalino (8.4) cuadros, con respecto al pH fisiológico (7.4) círculos; Huang et al., 1999; Rivera et al., 2000.

Entre los elementos que modulan fisiológicamente a los receptores GABA<sub>ρ</sub> es notable el efecto del Zn<sup>2+</sup>, un metal de transición abundante en algunas regiones del cerebro, así como en la retina. El Zn<sup>2+</sup> bloquea al receptor de manera dosis dependiente (EC<sub>50</sub> de 25 μM), es independiente del voltaje aplicado pero por otra parte, la magnitud del bloqueo es inversamente proporcional con la disminución del pH. Se encontró que una histidina (His 169), localizada en el gran dominio amino extracelular coordina en conjunto con otros residuos una unión estable con este metal, tal como ocurre con algunas metaloenzimas, desacoplando de esta manera las interacciones alostéricas que llevan a la distorsión del poro y a la activación del canal. De esta misma manera, la disminución del pH a valores ácidos disminuye en gran medida también la transferencia de electrones capaces de interactuar formando enlaces a nivel de la cadena lateral de la histidina, impidiendo así la coordinación del Zn<sup>2+</sup> y el desacoplamiento conformacional del canal (**Fig. 3A**) (Wang et al., 1995; Wang et al., 2001). Respecto a la cinética de activación se ha propuesto un modelo compuesto por cinco estados:

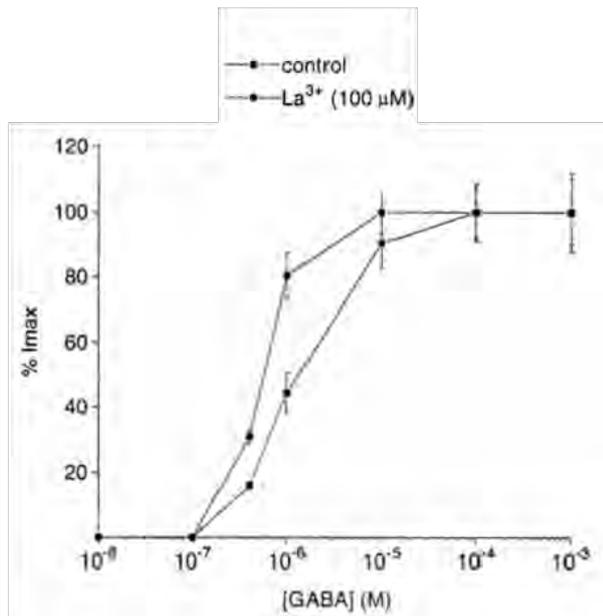


Cuando se retira el agonista se generan aparentemente dos distintos índices de disociación de GABA, uno rápido ( $\tau \approx 5.6$  s), producido por los receptores que no alcanzan directamente el estado abierto (principalmente AR y A<sub>2</sub>R); y uno lento ( $\tau \approx 28.9$  s), generado por los receptores unidos por completo al ligando (fundamentalmente A<sub>3</sub>R y A<sub>3</sub>R\*). En este proceso, el índice más rápido es el índice de disociación microscópico real del sitio de unión a GABA en los receptores unidos a una o dos moléculas de ligando; por otra parte, el índice más lento ocurre en los receptores activados, debido a que mientras el receptor se está abriendo, la disociación del agonista es inhibida. El agonista queda atrapado mientras el cambio alostérico distorsiona la estabilidad del poro de las subunidades relacionadas y la afinidad del sitio de unión por el ligando en ese momento se vuelve infinita (Chang et al., 1999). Además se han realizado experimentos con elementos capaces de modificar el estado de conducción del canal como es el caso de los lantánidos, como el Lantano (La<sup>3+</sup>), Gadolinio (Gd<sup>3+</sup>), y el Lutecio (Lu<sup>3+</sup>), los cuales son cationes trivalentes y a diferencia de los cationes divalentes como el Zn<sup>2+</sup> potencian el efecto del agonista llevándolo a un estado de mayor conducción. Se ha propuesto la naturaleza alostérica que tienen los lantánidos en el receptor GABA<sub>A</sub> (Calvo et al., 1994; Narahashi, 2000). En el caso específico del receptor homomérico GABA<sub>ρ</sub>1 se ha sugerido un segundo estado de apertura así como un nuevo estado de desensibilización en función del modelo cinético propuesto previamente (Chang y Weiss, 1999).

A



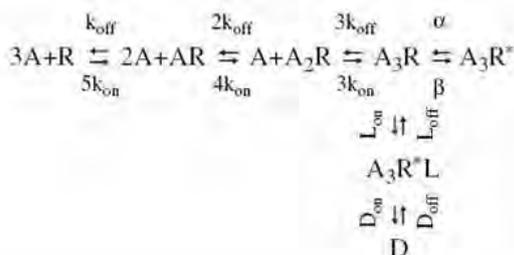
B



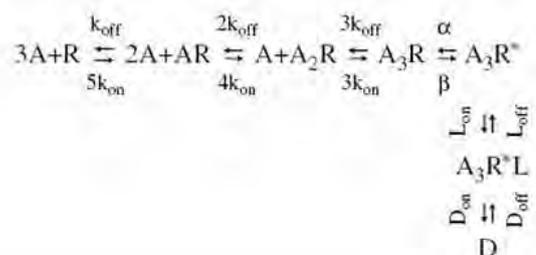
**Fig 3.** Modulación de la respuesta de GABA por  $Zn^{2+}$  o  $La^{3+}$ . A, curva dosis vs. respuesta mostrando el efecto del  $Zn^{2+}$  sobre las corrientes generadas por la aplicación de  $5 \mu M$  GABA en ovocitos inyectados con RNAc de GABA $\rho 1$  humano silvestre (círculos claros), o un mutante (His 156Tyr, círculos oscuros). La respuesta fue normalizada como el porcentaje de la corriente generada por GABA  $5 \mu M$  ( $I_x$ )/GABA  $5 \mu M$  coaplicando  $Zn^{2+}$  ( $I_0$ ). B, curva dosis vs respuesta a GABA (cuadros), o bien GABA coaplicando  $La^{3+}$   $100 \mu M$  (círculos), en ovocitos inyectados con RNAc de GABA $\rho 1$  humano. Calvo et al., 1994; Wang et al., 1995.

El efecto de los lantánidos fue independiente del potencial de membrana, lo cual sugiere que no hay un censado eléctrico a través de la membrana de tal manera que es improbable que éstos se unan a nivel del poro; por otra parte tienen un efecto modulador desplazando la curva dosis/respuesta a la izquierda, es decir requiriendo menores concentraciones de GABA en coaplicación con  $100-300 \mu M$  del lantánido ( $La^{3+}$ ,  $Gd^{3+}$  o  $Lu^{3+}$ ) para su activación (**Fig. 3B**) asumiendo que los lantánidos disminuyen la barrera energética para la unión de GABA al receptor, o bien modulan la transición entre el primer estado abierto  $A_3R^*$  y el estado cerrado  $A_3R$ , llevándolo a un nuevo estado de mayor conducción  $A_3R^*L$  a través de dos posibles modelos (Goutman et al., 2005).

Modelo 1

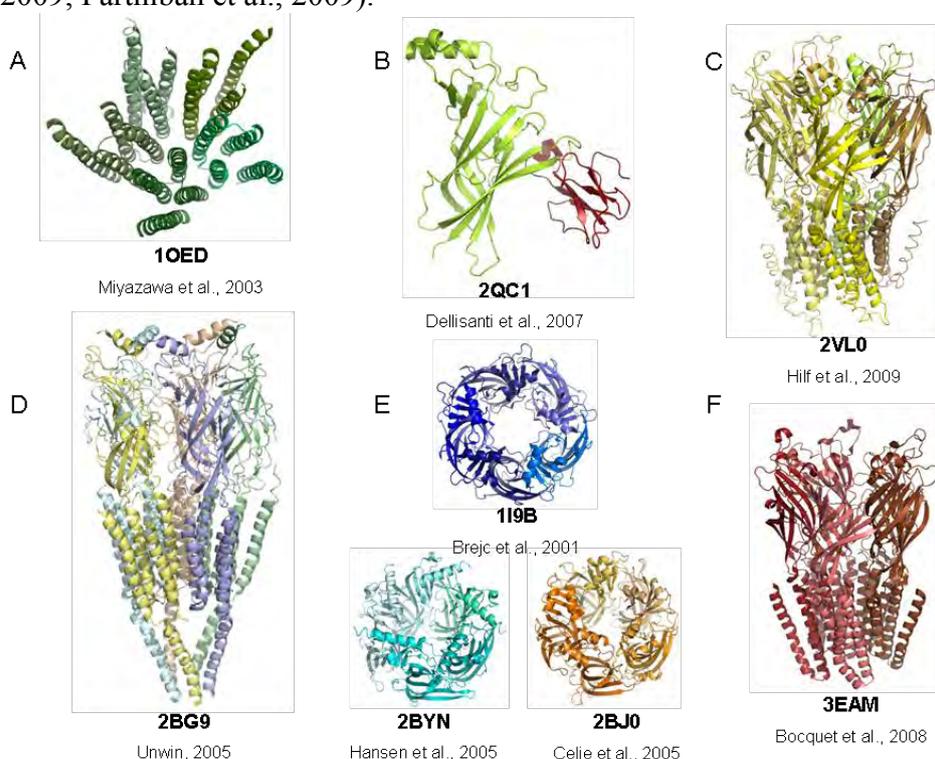


Modelo 2



## Estructura cuaternaria de los receptores pentaméricos activados por ligando

Actualmente no se tiene información ultraestructural derivada de estudios como resonancia magnética nuclear, o difracción de rayos X a partir de cristales obtenidos por alta resolución, o inclusive criomicroscopía electrónica de menor resolución generada a partir de los receptores GABA $\rho$ , ni otras combinaciones homoméricas o heteroméricas de receptores GABA $\alpha$ . Los datos estructurales más relevantes de esta familia de receptores fueron obtenidos del receptor de nACh mediante criomicroscopía electrónica de una preparación de membranas del órgano eléctrico del pez *Torpedo marmorata* (**Fig. 4A, D**) (Miyazawa et al., 1999; 2003; Unwin N, 2005). Aunque también han resultado de mucha utilidad los estudios realizados por difracción de rayos X de la fracción soluble extracelular de la subunidad  $\alpha$  del receptor nicotínico del ratón, unida a la  $\alpha$ -bungarotoxina (**Fig. 4B**) (Dellisanti et al., 2007); así como los estudios realizados usando la proteína de unión a acetilcolina de tres especies de caracoles, *Lymnaea stagnalis* (Brejc et al., 2001), *Aplysia californica* (Hansen et al., 2005; Ulens et al., 2009), y *Bulinus truncatus* (**Fig. 4E**) (Celie et al., 2005); y por último los canales iónicos pentaméricos activados por ligando obtenidos también por difracción de rayos X de dos bacterias distintas, la  $\gamma$ -proteobacteria *Erwinia chrisantemi* (**Fig. 4F**) (Hilf y Dutzler, 2008), y la cianobacteria *Gleobacter violaceus* (**Fig. 4C**) (Bocquet et al., 2009; Hilf y Dutzler, 2009), las cuales han sido utilizadas como moldes específicos para realizar estudios *in silico* y construir modelos por homología (Campagna-Slater et al., 2007; Speranskiy et al., 2007; Bisson et al., 2008; Haddadian et al., 2008; Cheng et al., 2009; Parthiban et al., 2009).



**Fig 4.** Estructuras utilizadas en la construcción de un modelo por homología del receptor GABA $\rho$ 1. A, poro del receptor nicotínico resuelto a 4 Å por criomicroscopía electrónica. B, dominio extracelular del receptor nicotínico unido a  $\alpha$ -bungarotoxina resuelto a 1.94 Å por difracción de rayos X. C, canal iónico pentamérico abierto por ligando de *Erwinia chrisantemi* resuelto a 3.3 Å por difracción de rayos X. D, receptor de acetilcolina nicotínico resuelto a 4 Å por criomicroscopía electrónica. E, proteínas de unión a acetilcolina resueltas a 2.7 Å, 2.02 Å, y 2 Å respectivamente por difracción de rayos X. F, canal iónico pentamérico abierto por ligando de *Gleobacter violaceus* resuelto a 2.9 Å por difracción de rayos X.

Con estos últimos se pueden realizar estudios de “*docking*”, identificando potenciales ligandos y/o moduladores, o bien interacciones proteína-proteína y así su posible interacción imitando las condiciones nativas del receptor embebido en la membrana mediante estudios de dinámica molecular (Hansen et al., 2005; Grazioso et al., 2009; Liu et al., 2009; Luttmann et al., 2009; Ulens et al., 2009).

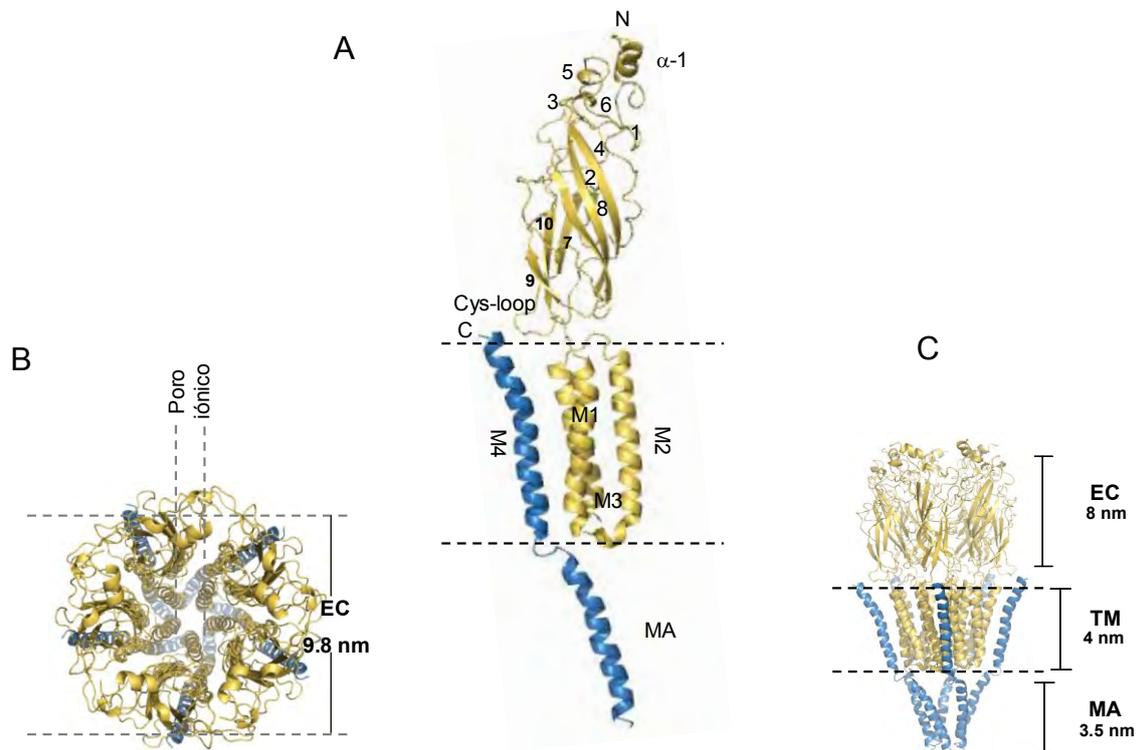
Todas las estructuras antes mencionadas forman complejos pentaméricos, con una simetría dextrorrotacional con respecto a un eje localizado en el centro del poro y un ángulo de inclinación de 10° (**Fig. 5B**) (Unwin, 2005; Auerbach, 2009; Cederholm et al., 2009). Los receptores GABA<sub>A</sub> comparten tres grandes dominios principales con todos los miembros de esta familia, el primero de ellos es un gran dominio N-terminal, el cual tiene una localización extracelular. Consta de 10 láminas β, 2 hélices α, y una hélice 3<sub>10</sub> (Unwin, 2005; Rucktooa et al., 2009; Yakel, 2009). Este dominio es muy similar a la conformación tipo sándwich β que presentan las inmunoglobulinas, su función es compleja, se destaca principalmente la localización del sitio de unión al ligando y el Cys-loop (Chang y Weiss, 1999; Unwin, 2002; Sedelnikova et al., 2005; Law et al., 2009). Además, por sí mismo conforma también un vestíbulo que contribuye en la preselección extracelular de iones a través de un potencial electrostático conferido por la superficie polar de la proteína, la cual se encuentra accesible al solvente (Unwin, 2005; Hansen et al., 2008).

El segundo gran dominio de suma importancia es el poro mismo, formado por la segunda (TM2), de cuatro hélices α transmembranales (TM1-TM4), mientras que las hélices remanentes (TM1, TM3, TM4), conforman una “abrazadera hidrofóbica”, que protege e incorpora al poro en la membrana plasmática (Miyazawa et al., 2003; Paas et al., 2005; Unwin N, 2005). El poro contiene además varios subdominios de gran importancia funcional tales como una “puerta”, la cual está asociada a residuos hidrofóbicos localizados en la región media de la hélice, y que se distorsionan estructuralmente una vez que el receptor es activado llevando así a cambios conformacionales globales (Chang et al., 1998; Martínez-Torres y Miledi, 2004; Cymes y Grosman, 2005; 2008) otro de estos subdominios consiste en un “filtro estricto de selectividad” el cual restringe de manera tanto estérica como electrostática a los iones y recae en la región más estrecha e intracelular del poro en el estado abierto (Le Novere y Changeux, 1995; Wotring et al., 1999; Miyazawa et al., 2003; Wotring et al., 2003; Sine et al., 2006). Está conformado por residuos cargados eléctricamente, y cuya carga de manera distintiva es contraria a la carga del ión para el cual permea, por ejemplo la arginina (Arg 313) es el residuo que confiere la selectividad a aniones en las subunidades de los receptores GABA<sub>A</sub> (Wotring et al., 2003; Filippova et al., 2004; Xiu et al., 2005; Peters et al., 2010).

El último de los grandes dominios comunes consiste en una gran asa de localización intracelular que conecta a las hélices α transmembranales 3 y 4 (TM3-TM4) y tiene una longitud variable, siendo uno de los dominios menos conservados a lo largo de toda la familia de receptores (Unwin, 2005); esto le confiere asimismo características funcionales muy importantes a cada subunidad y dependen a su vez de sus propiedades estructurales específicas, tales como el anclado o interacción con proteínas del citoesqueleto (Hanley et al., 1999), estabilización (Koulen et al., 1998), modulación y señalización intracelular (McCall et al., 2002; Song et al., 2005), localización (Vaquero et al., 1999; Pattnaik et al., 2000), internalización (Swope et al., 1992), tráfico, y probablemente juegan un papel clave en la conductividad iónica (Miyazawa et al., 2003; Unwin, 2005). Además constituye a un subdominio accesorio a la membrana a través de una hélice α (MA), cuya localización es también intracelular de manera inmediata anterior a la hélice transmembranal 4 (TM4), y forma una estructura parecida a un

embudo, la cual constituye un vestíbulo intracelular “trabeculado” en espacios o ventanas regulares por las cuales los iones son forzados a moverse a través de la membrana de acuerdo a su fuerza electromotriz (**Fig. 5A, C**) (Unwin, 2005; Carland et al., 2009).

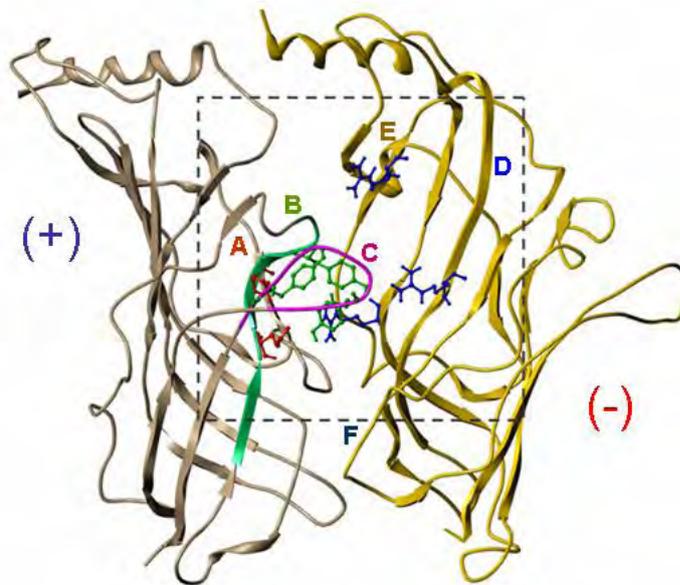
Algunos de los dominios antes mencionados serán revisados a mayor detalle debido a su participación crucial en los procesos de modulación alostérica. Se considerarán posteriormente también diversas propuestas basadas en datos experimentales que los han involucrado en mecanismos puntuales de activación e inactivación.



**Fig 5.** Diagrama de los principales dominios del receptor humano GABA $\rho$ 1 usando el modelo generado en este trabajo. A, subunidad representativa del receptor GABA $\rho$ 1 de un modelo generado por computadora; son resaltados con números cada una de las láminas  $\beta$  del dominio N-terminal extracelular así como las  $\alpha$ -hélices transmembranales, y un dominio intracelular accesorio a la membrana (MA). B, configuración pentamérica del receptor GABA $\rho$ 1 representada alrededor de un eje paralelo al plano de la membrana. C, pentámero representado en un eje perpendicular al plano de la membrana resaltando los tres dominios principales, extracelular (EC), transmembranal (TM), y accesorio a la membrana (MA).

### ***Dominio de unión a ligando***

Uno de los dominios más estudiados en el receptor GABA $\rho$ 1 es el de unión a ligando; actualmente se han realizado varios modelos por homología, utilizando como molde las diferentes estructuras reportadas de la proteína de unión a acetilcolina (AChBP) (Sedelnikova et al., 2005; Harrison y Lummis, 2006; Abdel-Halim et al., 2008; Osolodkin et al., 2009); sin embargo, el acoplamiento entre los diferentes residuos clave que desencadenan la apertura del poro requieren la adición de elementos más complejos y dinámicos en el sistema. La información es insuficiente si sólo consideramos a las estructuras antes mencionadas. Por algún tiempo se lograron obtener aproximaciones interesantes añadiendo dominios homólogos de otras proteínas para la construcción de un modelo preliminar (Trudell y Bertacini, 2004), no obstante, éste no explicaba por completo muchos de los datos experimentales hasta entonces conseguidos. Recientemente, nuevas estructuras proteicas obtenidas por alta resolución han arrojado resultados interesantes que pueden ayudar a entender mejor el complejo mecanismo de activación que conecta al sitio de unión de ligando con la distorsión estructural del poro (Bocquet et al., 2009; Hilf et al., 2008).



**Fig 6.** Esquema representativo del sitio de unión de ligando del receptor GABA $\rho$ 1 en la interfase del gran dominio extracelular de dos subunidades, la principal (+), y la accesoria (-), la primera contribuye conformando las asas A, B, y en mayor medida C (representada en color magenta), mientras que la segunda mediante las asas D, y E. Son resaltados algunos residuos críticos como Tyr 219, Tyr 262, y Tyr 268 (en color verde), Arg 125, Arg 179, Arg 191 (en color azul). Osolodkin et al., 2009.

En un pentámero homomérico constituido por la subunidad GABA $\rho$ 1 existen cinco potenciales sitios de unión a ligando, localizados en las interfases de dos subunidades entre las asas A, B y C de una subunidad (principal, ó +), y las asas D, y E de otra (accesoria, ó -) (**Fig. 6**). Una diferencia importante respecto al receptor nicotínico es que en el receptor GABA $\rho$ 1 el asa F no parece contribuir de manera importante al sitio de unión de ligando (Amin et al., 1994; Torres y Weiss, 2002; Sedelnikova et al., 2005; Harrison y Lummis, 2006). Se ha propuesto que cinco tirosinas (Tyr 123, Tyr 219, Tyr 221, Tyr 262, Tyr 268) tienen un papel fundamental estabilizando al extremo amino de GABA polarizándolo en una configuración estable por acción de uno de varios posibles enlaces a través de la polaridad parcial ejercida por los electrones conjugados deslocalizados en el anillo bencénico de la cadena lateral de las múltiples tirosinas generando una interacción llamada *cación- $\pi$*  (Dougherty, 2007), donde la asociación parcial con Tyr219 localizada en el asa B, el cual conecta a las láminas  $\beta$ -7 y  $\beta$ -8 parece ser particularmente estable (**Fig. 6**) (Galvez-Ruano et al., 1995; Harrison y Lummis, 2006; Melis et al., 2008; Osolodkin et al., 2009). Por otra parte, el extremo carboxilo de GABA forma puentes salinos estables con los residuos polares Arg 125, Ser 189, y Ser 264, dada la orientación de la molécula respecto a su interacción particular (Sedelnikova et al., 2005; Abdel-Halim et al., 2008; Osolodkin et al., 2009).

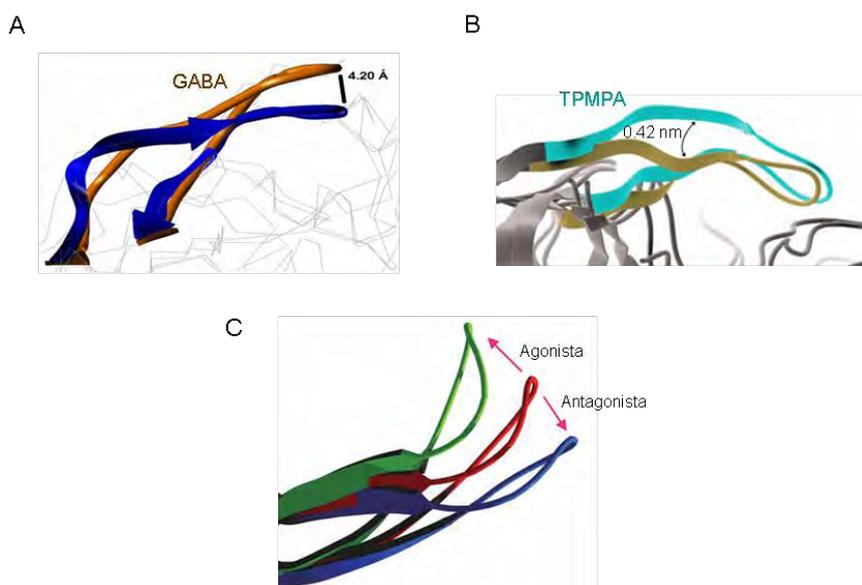
En general, los agonistas del receptor GABA $\rho$ 1 son en su mayoría análogos a GABA en su extremo carboxílico, el cual puede variar incorporando un grupo isoxazol, o ácido sulfínico. Los antagonistas por su parte son derivados del ácido fosfínico y metil fosfínico, cuyas estructuras son más grandes que las de los agonistas en general (Chen et al., 2006; Harrison y Lummis, 2006; Ci et al., 2007; Clayton et al., 2007; Abdel-Halim et al., 2008; Hinton et al., 2008; Zhang et al., 2008). Actualmente se cree que el asa C se repliega en el sitio de unión al ligando sobre la molécula unida, oprimiendo así el sitio de unión, tal como ocurre en la proteína de unión a acetilcolina de (Hansen et al., 2005; Chupakhin et al., 2006; Gao et al., 2006; Ulens et al., 2006, Babakhani et al., 2009). A partir de estudios en los cuales se realizaron mutaciones puntuales se han encontrado algunos residuos críticos asociados a la función de la proteína, actuando de manera cooperativa al sitio de unión, entre ellos Trp 154, Pro 156, Phe 160 en el asa A; Gly 184, Arg 179, Leu 187 y Ser 189 en el asa E. Por otra parte, los residuos Asp 157, Phe 159, y Val 161 en el asa A y Val 176, Met 177, Val 180, Ser 189, y Arg 191 en el asa E son reclutados ante la unión del ligando, cambiando de conformación y actuando como potenciales donadores de electrones para la formación de puentes de hidrógeno (**Fig. 6**) (Amin et al., 1994; Lummis et al., 2005; Harrison y Lummis, 2006; Zhang et al., 2008; Adamian et al., 2009; Cederholm et al., 2009).

La longitud de la molécula de GABA que parte desde el átomo de nitrógeno en un extremo y el carbono carboxílico del otro es igual a 3.58 Å, y corresponde a la conformación plegada energéticamente más estable. El tiempo medio de asociación está dado por la formación de puentes de Hidrógeno en el extremo amino y la estabilización por la dispersión electrónica de Tyr 219 en un momento determinado y la unión del grupo carboxilato de GABA por la formación de puentes de Hidrógeno con el esqueleto amida o el grupo hidroxilo de Ser 189, o bien la formación de un puente salino con Arg 125 (Padgett et al., 2007; Lummis, 2009; Osolodkin et al., 2009). La interacción con Tyr 219 se lleva aproximadamente un 23.8 % del tiempo total, Ser 189 un 14 % y con Arg 125 13.2% de éste. La interacción con las otras tirosinas y demás residuos asociados con el dominio de unión consumen el 49% del tiempo restante. Estas tirosinas conforman una “*caja aromática*” que mantiene fuertemente acoplada a la molécula; sin embargo, en un momento determinado la molécula cambia de conformación de plegada a extendida de manera estocástica, desacoplándose así de la caja y posteriormente de la

interfase de subunidades, regresando a una conformación disociada estable (Osolodkin et al., 2009; Lummis, 2009).

### Asa C

El asa C es un dominio clave en la interacción con el ligando, no sólo en los receptores GABA<sub>A</sub> sino en todos los canales iónicos pentaméricos activados por ligando. En todos los casos se encuentra conservado al menos un residuo hidrofóbico, cuya cadena lateral contiene un anillo bencénico (típicamente tirosina, y fenilalanina, y en menor medida triptofano), que se sabe interactúa estabilizando de manera importante tanto al ligando endógeno como a varios moduladores (Corringer et al., 2000; Unwin N, 2005; Melis et al., 2008). Su conformación en presencia del ligando favorece la entrada a la cavidad conformada por el conjunto de asas en la interfase atrapando de esta manera al ligando y a su vez cambiando de conformación (Chang y Weiss, 1999). El asa C se conecta directamente con la primer hélice  $\alpha$  transmembranal (TM1) a través de la lámina  $\beta$ -10, y por tanto puede propagar el cambio conformacional que ocurre después de la unión del agonista, uniendo la interfase entre los dominios extracelular y transmembranal (Xiu et al., 2005; Purohit et al., 2007; Auerbach, 2009; Bartos et al., 2009). Durante la activación el o los dominios aromáticos rompen o desestabilizan un puente salino formado por dos residuos polares localizados entre las láminas  $\beta$ -7 y  $\beta$ -10 (Mukhtasimova et al., 2005). El movimiento de esta asa parece ser el cambio inicial que subyace a la activación del canal dada la unión del ligando (**Fig. 7**), sin embargo, es importante destacar que la cinética de apertura requiere de la participación de todas las asas extracelulares antes mencionadas como una compleja red de interacciones acopladas conformacionalmente (Cederholm et al., 2009; Taly et al, 2009; Zhu y Hammer, 2009).

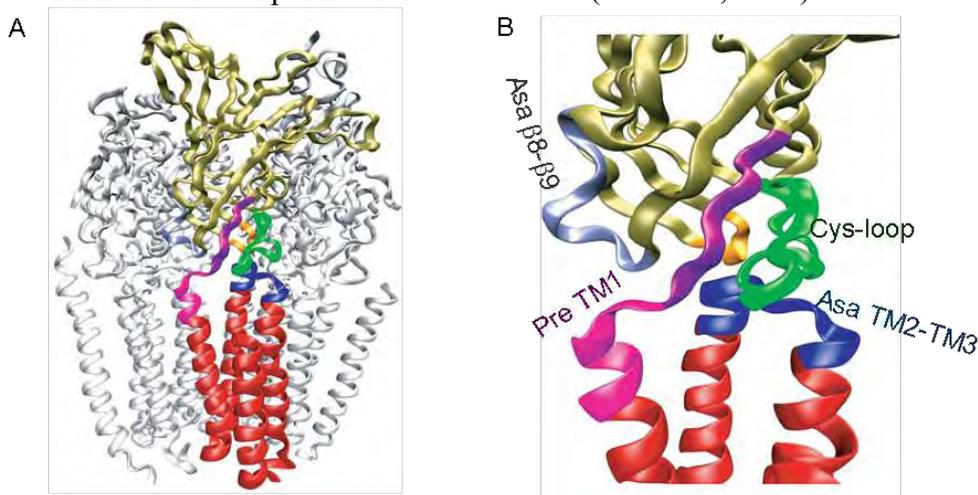


**Fig 7.** Representación del movimiento medio (0.42 nm) ocurrido en el asa C, inducido conformacionalmente por la unión de un ligando en el sitio de unión, ya sea GABA atrapando a éste, A; o TPMPA en la dirección contraria, B; de manera diferencial, C. Abdel-Halim et al., 2008; Osolodkin et al., 2009; Chang et al., 2009.

Existe además evidencia de que en esta familia de canales pentaméricos se encuentra un residuo conservado en el “Cys-loop”, cuya cadena lateral consiste en un grupo polar (asparagina, o glutamina en canales catiónicos y treonina en los aniónicos) que es parte de un grupo consenso de glicosilación. La cadena del oligosacárido enlaza al “Cys-loop” con la parte posterior del asa C, sugiriendo que puede tener una participación acoplando la unión del agonista a la apertura del poro. Esta hipótesis es soportada por estudios experimentales que muestran que la remoción del carbohidrato afecta las propiedades funcionales; no obstante, es improbable que todo el peso en el mecanismo de apertura caiga en sólo unos pocos residuos; la evidencia en los últimos años sugiere que los movimientos de dominios acoplados al sitio de unión son propagados a través de las mismas láminas  $\beta$ , las cuales desencadenan rearrreglos en la interfase extracelular-transmembranal desestabilizando en su conjunto algunos residuos clave cerca del dominio de poro (Nishizaki, 2003; Dellisanti et al., 2007), las propuestas de activación serán analizadas a detalle más adelante.

### “Cys-loop”

Localizada casi en la interfase entre el espacio extracelular y la membrana, conectando a las láminas  $\beta$ -6 y  $\beta$ -7 se encuentra el asa distintiva de esta familia de receptores conocida como “Cys-loop”, y como previamente se mencionó es llamada así por el enlace disulfuro formado entre dos cisteínas separadas por una cadena polipeptídica que en muchas subunidades consta de 13 residuos, y que sin embargo estas cisteínas no existen en las proteínas homólogas ancestrales de procariontas (Cockcroft et al., 1990; Smith y Olsen, 1995; Tasneem et al., 2005). El Cys-loop se introduce entre la región pre M1 (cerca del extremo C-terminal) y el asa extracelular que conecta las hélices transmembranales TM2-TM3 (cerca del extremo N-terminal). Este dominio es esencial para el ensamblado del receptor. Su papel crucial en la apertura del canal ha sido ampliamente demostrado para todos los miembros de esta familia (**Fig. 8**). En el receptor GABA $\rho$ 1 existe un residuo cargado eléctricamente (Asp 208) que durante la activación y la consecuente apertura del poro interactúa con otro residuo con carga contraria (Lys 342), localizado en el asa que conecta TM2-TM3 estabilizándose mediante la formación de un puente salino transitorio (Xiu et al., 2005).



**Fig 8.** Dominios acoplados durante el mecanismo de activación del receptor. A, se resalta una subunidad dentro del complejo pentamérico de la proteína, son apreciados los dominios transmembranales (en color rojo), y el dominio extracelular (en color amarillo). B, detalle de la interfase del acoplamiento de los dominios extracelular y transmembranal, se identifican los dominios Cys-loop (en color verde), asa TM2-TM3 (en color azul), asa  $\beta$ 8- $\beta$ 9 (en color gris), segmento Pre TM1 (en color magenta), asa  $\beta$ 1- $\beta$ 2 (en color naranja). Bouzat et al., 2008.

La interacción específica de pares iónicos es crítica para la conexión en la interfase; en este caso ocurre un mecanismo integral que puede involucrar a más de un par iónico (Absalom et al., 2003; Wang et al., 2007; Tierney et al., 2008). Estos cambios conformacionales intermediarios requieren una baja energía de activación, y son además espontáneos termodinámicamente. Además se ha identificado a estos residuos altamente conservados en todos los miembros de la familia de receptores, y su función es fundamental acoplando dominios; cuando éstos son sustituidos por residuos con carga contraria producen receptores no funcionales, los cuales a su vez pueden restablecer su función al sustituir al residuo de interacción en el asa TM2-TM3 por otro residuo equivalente capaz de interactuar, formando así el o los puentes transitorios (Jha et al., 2007; Purohit et al., 2007). Por otra parte, se ha encontrado además que esta asa interactúa con algunos de los residuos del C-terminal en TM4, tal como se ha corroborado que ocurre en el receptor nACh y en algunas quimeras de éste (Pons et al., 2004). Al parecer, el mecanismo esencial de interacción se conserva en todos los miembros de la familia, sin embargo los detalles precisos involucrando a residuos particulares varía de sistema a sistema.

### *Asa $\beta 8$ - $\beta 9$*

El papel del asa que conecta a las láminas  $\beta$ -8 y  $\beta$ -9 es pobremente entendido, sin embargo la evidencia sugiere que está involucrada en el proceso de activación del canal, esta asa es variable en su longitud, en la mayoría de los casos es extensa y es uno de los dominios con menor conservación a lo largo de todos los miembros de esta familia de proteínas. A pesar de su variabilidad se ha encontrado un glutamato conservado (Glu 241), el cual experimenta cambios inducidos por la unión del ligando, particularmente de los agonistas pues los antagonistas no lo inducen. Es un movimiento especialmente asociado a las subunidades en cuya asa C se encuentra unido un agonista, y se ha propuesto como un posible dominio involucrado en los cambios conformacionales globales que llevan a la desestabilización estructural del poro (Bouzat et al., 2004; 2008).

### *Dominio transmembranal TM2 (Región de poro)*

Diversos estudios tanto moleculares como electrofisiológicos (Xu et al., 1993; 1996) han mostrado que el poro iónico se forma esencialmente por los dominios transmembranales TM2 de cinco subunidades alineadas en la parte central de la proteína conformando así una estructura parecida a un anillo. El alto nivel de conservación de aminoácidos en este dominio respecto a todos los miembros que integran a la familia de canales iónicos pentaméricos activados por ligando pueden asociarlo directamente a la estructura ya conocida del receptor nicotínico reportada previamente, conservando un marco tridimensional y sus funciones asociadas de acuerdo a un patrón general que preserva los mismos principios fisicoquímicos (Miyazawa et al., 2003; Unwin, 2005). El poro presenta una marcada reducción en su diámetro, que se proyecta a lo largo de toda la membrana y se debe a una inclinación radial de las hélices  $\alpha$  (TM2) hacia el eje principal hasta alcanzar la mitad de la membrana (**Fig. 9B**). En contraste, las hélices externas (TM1, TM3, y TM4) se inclinan, tanto radial, como tangencialmente alrededor del eje principal en el centro del poro. Las hélices se separan entre sí al nivel de la superficie extracelular de la membrana (de 12.5-15 Å). El conjunto de hélices internas y

externas se aproximan entre sí hacia la mitad de la membrana, creando un hueco que se extiende hasta el espacio intracelular, donde en el estado abierto alcanza un diámetro de 5.3 a 6 Å (**Fig. 9D**) (Bormann et al., 1987; Fatima-Shad y Barry, 1993; Wotring et al., 1999). Esto sugiere que existen dos componentes estructurales esenciales, un anillo interno, que interactúa directamente con el paso central de los iones, y un revestimiento que resguarda y protege a este anillo del ambiente lipídico de la membrana integrándolo con ésta. Es notable que a diferencia de los receptores GABA $\rho$ , en otras combinaciones de receptores GABA $\alpha$ , y receptores de glicina se haya identificado un dominio de unión a alcoholes y anestésicos el cual parece encontrarse en una cavidad llena de agua, localizada en el punto que conecta el poro con su revestimiento, entre la hélice  $\alpha$  transmembranal TM2 y el conjunto de hélices TM1, TM3, y TM4. Los residuos involucrados son una serina (Ser 270), de naturaleza polar y localizada en TM2 orientada al espacio accesible al solvente en la cavidad, y una leucina (Leu 232), de naturaleza hidrofóbica orientada en la misma dirección que la anterior, pero con una localización más interna e hidrofóbica dentro de la cavidad. Debido a la naturaleza anfifílica espacial, moléculas polares y moderadamente hidrofóbicas (como los alcoholes) pueden tener un importante efecto ortostérico (Mihic y Harris 1996; Ueno et al., 1999; Jung y Harris, 2006; Santhakumar et al., 2007). Un detalle interesante a considerar en el receptor GABA $\rho$ 1, en función de la estructura conocida del poro del receptor nicotínico es la naturaleza misma del control de su permeabilidad, aparentemente no resulta indispensable que éste se encuentre físicamente obstruido para impedir el paso de los iones (Roth et al., 2008). Al parecer, la geometría del poro (es decir su radio, forma, y longitud) y la naturaleza química de la hélice  $\alpha$  que lo conforma tiene una gran influencia sobre sus propiedades de conducción tanto para iones como moléculas de agua (**Fig. 9B**). Respecto a su función, los datos reportados sugieren que la mitad extracelular del poro es más dinámica que la interior, posiblemente debido a que contiene un mayor número de residuos polares capaces de interactuar con el solvente respecto a la parte interior (Wilson y Karlin, 2001; Goren et al., 2004).

La estructura original producida a partir del receptor nicotínico fue procesada en ausencia del ligando; entonces se presume que el canal se encuentra en un estado cerrado funcionalmente. Sin embargo, la zona más estrecha del poro es lo suficientemente amplia para permitir el paso de tres moléculas de agua, o bien de un ión monovalente acompañado con dos moléculas de agua flanqueándolo a ambos extremos (**Fig. 9D**) (Paas et al., 2005; Beckstein y Sansom, 2006; Corry, 2006). Esto produciría aparentemente una paradoja pues sugiere que el poro en el estado cerrado no se encuentra totalmente ocluido, una posible respuesta a esta aparente contradicción yace en el concepto de una barrera energética, pues se requeriría una gran cantidad de energía para su desolvatación ( $-340.7 \text{ kJ mol}^{-1}$  para el ión  $\text{Cl}^-$ , Ichikawa et al., 2001), así el paso del ión se encontraría energéticamente desfavorecido y por lo tanto bloqueado.

### ***Compuerta en el canal***

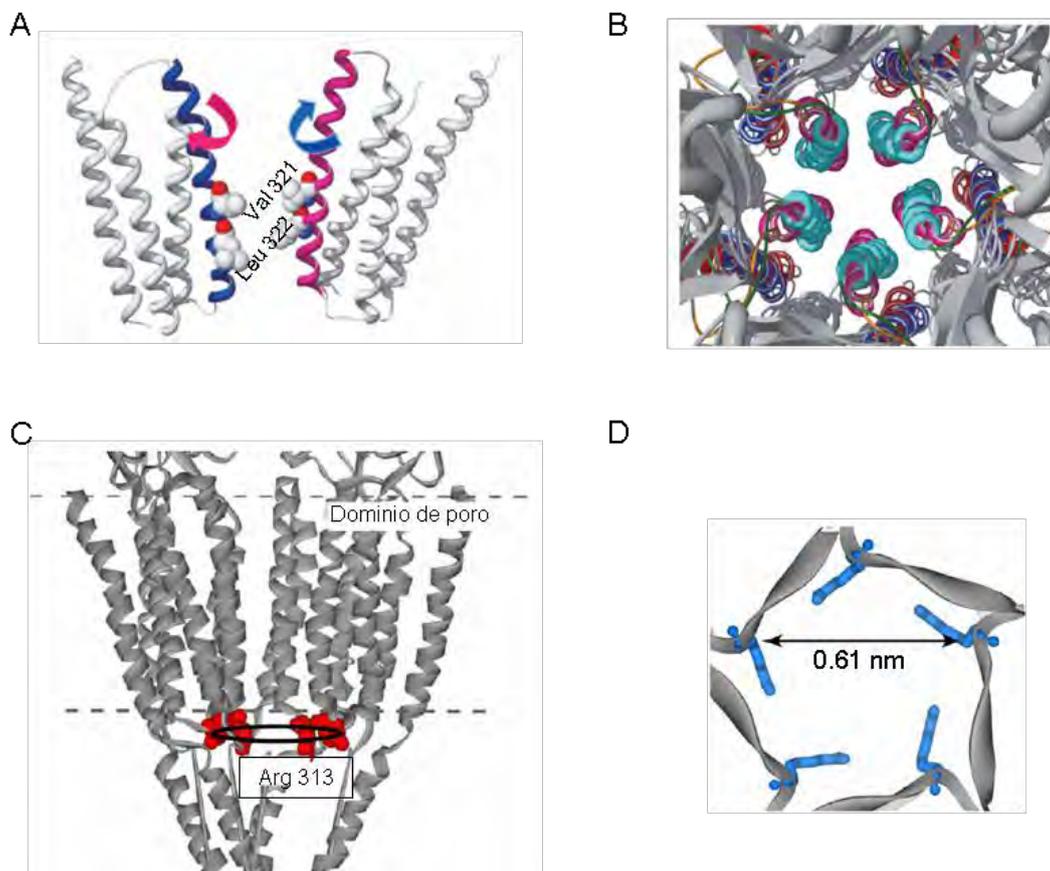
El poro tiene justamente algunas propiedades particulares a la mitad de la membrana que sugieren un mecanismo que consta de una barrera energética. En el estado libre de ligando (no conductor) ésta es la región de mayor constricción física, y es producida por una separación mínima de las hélices  $\alpha$  transmembranales TM2 debido a la presencia de residuos con cadenas laterales hidrofóbicas, generando así una ligera restricción estérica (**Fig. 9A**) (Miyazawa et al., 2003; Unwin, 2005). Además esta región tiene una arquitectura simétrica debido a interacciones adyacentes, de una cadena lateral a otra

ocurriendo en superficies equivalentes, de manera transversal a través de residuos homólogos, valina, leucina, isoleucina y alanina. Estas interacciones estrechan a las hélices  $\alpha$  vecinas generando un ceñido cinturón hidrofóbico alrededor del poro; de hecho, la barrera de desolvatación antes mencionada sólo es efectiva si en su arquitectura el ión hidratado es incapaz de sustituir temporalmente a una de sus moléculas de agua por grupos hidroxilo provenientes de las cadenas laterales de aminoácidos polares o bien del esqueleto polipeptídico (**Fig. 9A**) (Beckstein y Sansom, 2006; Corry, 2006; Ivanov et al., 2007). La constricción debe ser producida específicamente por las cadenas laterales de los residuos hidrofóbicos, de tal manera que sus grupos metilo no participen desolvatando al ión. En el estado cerrado, la distancia radial mínima desde el eje hasta la primera superficie de van der Waals es de aproximadamente 3 Å, y corresponde a Leu 322 en el receptor GABA $\rho$ 1, donde el poro es más estrecho. Tal como se mencionó, este calibre es demasiado restringido para permitir el paso de un ión Cl<sup>-</sup> con su primera capa de hidratación, pues éste es incapaz de perder parte de su cubierta hídrica en ausencia de superficies polares. El cinturón crea por tanto una fuerte restricción energética a través de la bicapa lipídica (**Fig. 9A**). Por ser la única barrera identificada a través de la vía de conducción iónica, ésta se asocia de manera específica con un mecanismo de compuerta en el poro (Corry, 2006). La sustitución de estos residuos hidrofóbicos a través de mutagénesis, intercambiándolos por residuos polares altera las propiedades de permeabilidad a causa de una perturbación en los contactos hidrofóbicos que debilitan al cinturón e incrementan la estabilidad relativa en el poro durante el estado abierto (Pan et al., 1997; Chang y Weiss, 1998; Martínez-Torres y Miledi, 2004).

### ***Filtro de selectividad***

El poro contiene un filtro de selectividad, es decir una estructura que determina que tipo de iones pueden pasar a través del canal. Muchos estudios han sido orientados a la localización de este dominio; se sabe que existe homología en la  $\alpha$  hélice transmembranal 2 (TM2) de esta familia de proteínas, especialmente entre los receptores que son permeables a los iones de la misma polaridad (Adcock et al., 1998; Keramidas et al., 2002). Existen tres residuos críticos cargados eléctricamente, los cuales se encuentran conservados en los canales permeables a aniones y que tienen una carga contraria con respecto a los canales que permean cationes, por ello han sido implicados directamente en el mecanismo de selectividad iónica (Keramidas et al., 2002). Estos tres residuos tienen las posiciones -2', -1', y 13' en el sistema de numeración Universal para el dominio TM2 en los canales iónicos pentaméricos activados por ligando (Galzi et al. 1992; Keramidas et al. 2000; Gunthorpe et al., 2001; Jensen et al. 2002; 2005). Algunas mutaciones puntuales realizadas en la hélice  $\alpha$  transmembranal TM2 le dan soporte a la propuesta de que éste se encuentra entre las posiciones -2' a 2', siendo así los determinantes principales de selectividad en todos los miembros de esta familia. Los receptores GABA $\rho$  contienen un consenso de tres residuos que se extienden desde el límite en la región intracelular hasta el inicio de la hélice  $\alpha$  TM2, que conforma al poro, y son prolina, alanina, arginina. Se ha propuesto que la prolina siendo un residuo hidrofóbico puede restringir y orientar la dirección de la cadena lateral de Arg 313, cargada positivamente hacia el interior del poro a través de Ala 312, cuya estructura puede servir a manera de bisagra, debido al mínimo impedimento estérico de su cadena lateral (**Fig. 9C**) (Keramidas et al., 2002; Lee et al., 2003). La enorme carga positiva de la arginina tiene un papel muy importante pues

conforma un anillo de cargas que se localiza en la porción más interna del canal, casi al límite intracelular de la membrana, y que en función del cambio conformacional que ocurre a nivel del poro, desencadenado por la unión del ligando, se convierte en la región más estrecha restringiendo estrictamente el paso de iones cargados negativamente (**Fig. 9C**) (Sankararamakrishnan et al., 1996). En un estudio se realizó sistemáticamente una serie de mutaciones puntuales y se demostró que el receptor GABA $\rho$ 1 homomérico cambió de selectividad pasando de aniónico a catiónico al cambiar sólo a dos residuos (en las posiciones -2' y -1'), e incluso el mismo efecto se puede encontrar al cambiar un residuo vecino al residuo crítico (Arg, -1') en la posición equivalente de los canales catiónicos, introduciendo así un residuo extra (Glu, -1' considerando la posición equivalente de Arg, en este caso Lys, 0') y generando un poro preferentemente catiónico. Por otra parte, la mutación en la posición conservada 13' no tuvo ningún efecto perceptible sobre la selectividad o la permeabilidad en general, sugiriendo que al menos en este receptor dicho residuo no confiere de manera determinante elementos estructurales que impacten la función del canal a nivel electrostático (Wotring et al., 2003).



**Fig 9.** Esquema de todos los dominios acoplados a la vía permeable. A. Dominio de poro, las hélices azul y magenta representan el movimiento requerido para desplazar el o los residuos hidrofóbicos que impiden el paso de los iones (compuerta). B, sobreposición de hélices esquematizando los estados cerrado (en color magenta) y abierto (en color azul) del canal iónico. C, representación del filtro de selectividad iónica del receptor GABA $\rho$ 1 como un anillo electrostático (Arg 313), localizado en el límite inferior del dominio de poro, en la interfase citoplásmica. C, diámetro estimado del poro a nivel del filtro de selectividad en el estado conductor (abierto). Hansen et al., 2008; Chang et al., 2009.

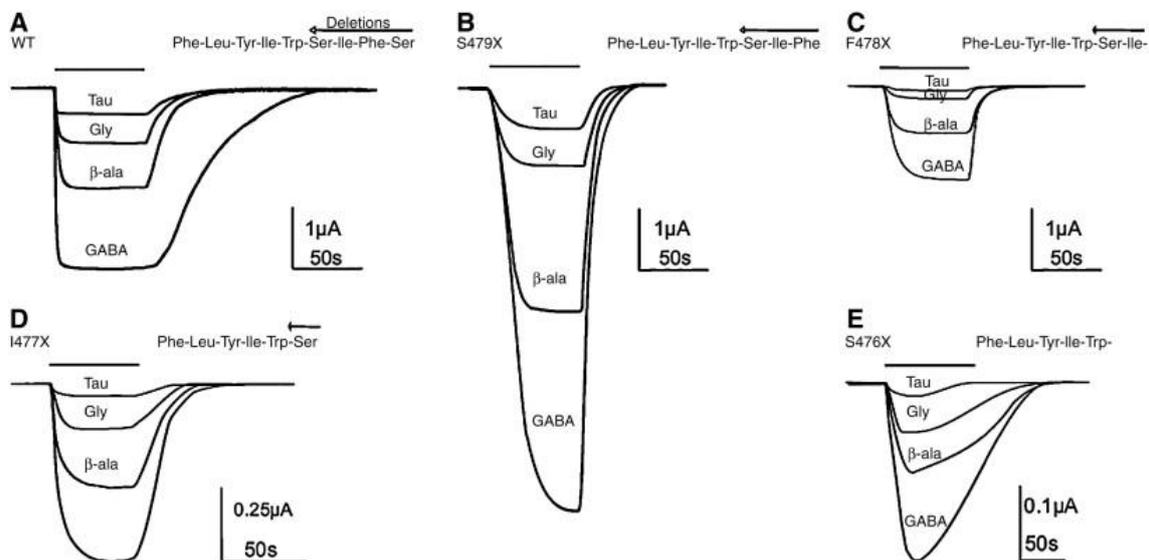
Una vez que se ha acumulado suficiente información funcional se pueden realizar entonces estudios computacionales que permiten conocer la dinámica por la cual estos iones se mueven puntualmente a través del poro de manera selectiva (Adcock et al., 1998; Sansom et al., 2000; Amiri et al., 2005; Benfenati y Ferroni, 2009). Esencialmente se traza un modelo atómico ideal que contenga la proteína-canal ya sea en el estado abierto o cerrado, las moléculas de agua como solvente universal ocupando el poro, un contorno de lípidos que rodean a la proteína, y una porción de agua libre a ambos lados del canal (Gordon et al., 2009; Pezeshki et al., 2009). A continuación se colocan unos cuantos iones en el solvente polar, se fija la temperatura, y se aplica un gradiente de potencial eléctrico o de concentración. Luego, se mide directamente el flujo iónico en función del tiempo a medida que el programa en la computadora calcula la dinámica atómica del modelo (Cheng et al., 2009; Khalili-Araghi et al., 2009; Law y Lightstone, 2009). En cada paso de la simulación se calculan todas las fuerzas que actúan sobre cada átomo (cargas fijas, dipolos, etc.) y el átomo se mueve bajo estas fuerzas durante un lapso de tiempo lo suficientemente pequeño como para considerar las fuerzas constantes, pero lo suficientemente grande al menos para observar cómo un ión atraviesa el canal (Tai et al., 2008; Ollila et al., 2009). El parámetro más importante a considerar en la proteína es la carga interior del poro, donde los iones se distribuyen para formar una doble capa eléctrica o doble capa difusa en el estado conductor (Adcock et al., 1998). Este reordenamiento es una consecuencia del equilibrio entre las tendencias opuestas de difusión térmica e interacción electrostática con la pared. Posteriormente se pueden considerar todos los elementos estructurales que alejan al poro de su estado ideal, y en que medida afecta el desvío de esta forma cilíndrica ideal de una sección del poro, supuesta en el modelo estándar de la carga espacial. Esta corrección incluye además las cargas fijas de los residuos ionizados (Arg 313) que al interactuar con iones de distinta polaridad eléctrica dan lugar a un momento dipolar que afecta el transporte a través de la membrana (Bezanilla, 2008; Forney et al., 2008; Huang et al., 2008; Aguilera-Arzo et al., 2009; Burada et al., 2009; Portella y de Groot, 2009).

#### ***Dominio transmembranal TM4***

La interfase extracelular-transmembranal es un elemento clave para el acoplamiento entre la unión del agonista y la apertura del canal, así como para mantener estabilizada esta conformación por un tiempo determinado, generando así en algunos casos un mecanismo de insensibilización (Pons et al., 2004; Gee et al., 2007; Lee et al., 2009). Este dominio es asociado entonces de manera directa con el inicio, estabilidad, y periodo refractario de la respuesta sináptica. El dominio TM4 es el menos conservado de todos los dominios transmembranales y es el más hidrofóbico. La región C-terminal que se encuentra justo al final del dominio TM4 se localiza precisamente en la interfase antes mencionada; en esta porción ocurren interacciones entre los residuos de este segmento de la  $\alpha$ -hélice y algunos residuos en el dominio extracelular, incluyendo al Cys-loop, y que es sustentando con evidencia experimental, no sólo en los receptores GABA<sub>A</sub>, sino en varios miembros de esta familia (Lee et al., 1994; Lasalde et al., 1996; Ortiz Miranda et al., 1997; Tamamizu et al., 1999; Jenkins et al., 2002; Miller et al., 2004; Mitra et al., 2004; Adamian et al., 2005; Lobo et al., 2006; Roccamo y Barrantes, 2007; Bouzat et al., 2008; Butler et al., 2009; Villmann et al., 2009), mostrando que este segmento contribuye directamente a la cinética de apertura del canal, y que éste se pliega durante dicha apertura. Recientemente se publicó un trabajo en el que se pone de

manifiesto el valor que tiene el dominio C-terminal de TM4 en el receptor GABA<sub>A</sub>1 al realizar una serie de deleciones sistemáticas en este último, y expresándolas a su vez en ovocitos. Las corrientes generadas evidenciaron cambios interesantes tanto en la cinética de apertura y cierre, así como en su magnitud. Los resultados mostraron que el receptor permite la remoción de varios residuos en el dominio TM4 hasta llegar a un punto crítico, Trp 475 a partir del cual el dominio pierde por completo sus propiedades funcionales (**Fig. 10**) (Reyes-Ruiz et al., 2010). Otro de los estudios más significativos que ha resaltado la importancia de este dominio comprende la creación de una quimera que contiene el extremo N-terminal del receptor nicotínico  $\alpha 7$ , y el C-terminal del receptor 5HT<sub>3A</sub>, de tal manera que ante la generación sucesiva de mutantes puntuales que eliminan uno a uno los residuos del extremo carboxilo disminuye también progresivamente la afinidad por la  $\alpha$ -bungarotoxina, un antagonista específico del receptor nicotínico  $\alpha 7$ .

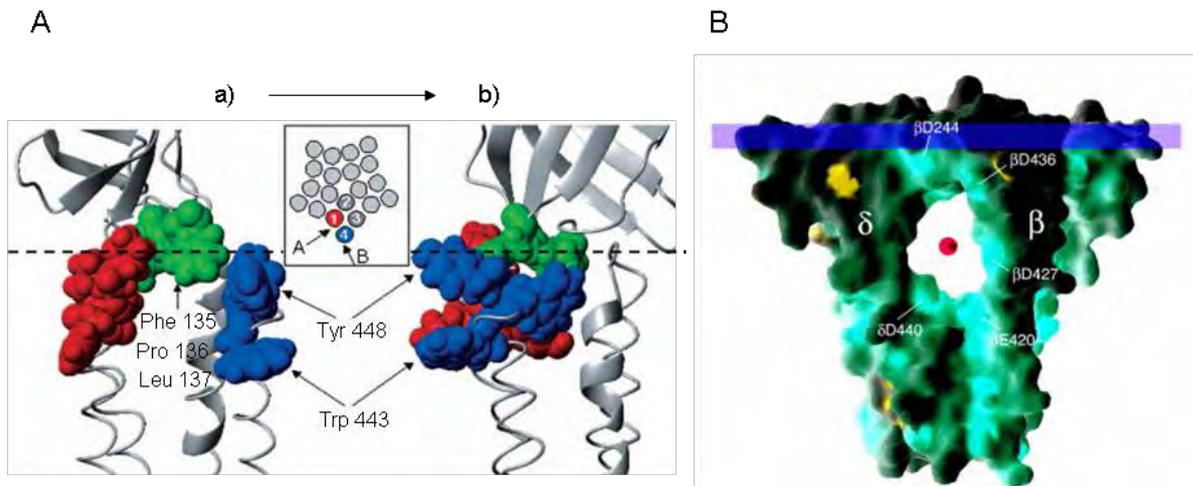
Al eliminar el sitio correspondiente a un residuo aromático hidrofóbico (Tyr 448) se eliminó también por completo la interacción con esta molécula, que a su vez fue restituido al sustituir esta posición por los residuos triptofano o fenilalanina, mostrando que el carácter aromático e hidrofóbico del residuo era un elemento clave en la interacción, y además que esta sección del dominio C-terminal se localiza en la interfase del gran dominio N-terminal extracelular y el límite extracelular de la membrana sugiriendo así que éste interactúa con un dominio hidrofóbico conservado en el “Cys-loop” (FPF), mostrando que la interacción entre Tyr 448 y el “Cys-loop” sujetaría a los dominios N-terminal y C-terminal estabilizando a la molécula en una conformación que es la adecuada para la unión del ligando, actuando a manera de sujetador conformacional (**Fig. 11A**) (von Heijne y Gavel, 1988; Ippolito et al., 1990; Fonseca et al., 1992; De Planque et al., 2002; Pons et al., 2004; Draheim et al., 2005).



**Fig 10.** Expresión funcional de mutantes de deleción en el C-terminal de TM4. A, respuesta característica de la cinética del receptor silvestre (WT). B, Ser 479 $\Delta$ , aumento en la magnitud de la corriente y en la  $\tau$  de inactivación. C, Ser 479-Phe 478 $\Delta$ , disminución en la magnitud de la corriente y en la  $\tau$  de inactivación. D, Ser 479-Phe 478-Ile 477 $\Delta$ , disminución en la magnitud de la corriente y en la  $\tau$  de activación así como la  $\tau$  de inactivación. E, Ser 479-Phe 478-Ile 477-Ser 476 $\Delta$ , disminución importante en la magnitud de la corriente y en la  $\tau$  de activación y aumento dramático de la  $\tau$  de inactivación. A partir de la deleción Ser 479-Phe 478-Ile 477-Ser 476-Trp 475 $\Delta$ , los receptores no fueron funcionales. Reyes-Ruiz et al., 2010.

### *Asa intracelular TM3-TM4 (dominio accesorio MA)*

El dominio TM3-TM4 continuado por el dominio accesorio MA constituye un vestíbulo intracelular que contiene residuos cargados eléctricamente, con una polaridad mayormente positiva, como ocurre en el dominio de filtro selectivo a nivel del poro. Esta polaridad electrostática afecta a los iones en tránsito en un microambiente que los estabiliza, y lo cual incrementa su acumulación con respecto a los cationes cerca del acceso intracelular del poro, promoviendo así el transporte eficiente de manera bidireccional a través de todo el canal iónico (**Fig. 11B**) (Unwin, 2005). Es probable que estos vestíbulos contribuyan de manera importante a una preselektividad en la polaridad de la carga eléctrica, favoreciendo al filtro de selectividad estricto deslocalizando así parcialmente su función, pero al mismo tiempo incrementando su eficacia. Los vestíbulos están separados entre sí por espacios que asemejan ventanas por las cuales los iones “preseleccionados” pueden acceder. A través de distintas evidencias experimentales se ha probado que estos dominios no son precisamente fundamentales para la función de la proteína como un canal iónico (Jansen et al., 2008), sin embargo, incrementan la conductancia en algunos casos hasta más de 40 veces, potenciando significativamente así su función (**Fig. 11B**) (Kelley et al., 2003; Kracun et al., 2008; Carland et al., 2009; Peters et al., 2010). Por otra parte respecto a la conocida función de asociación con otras proteínas, se sabe que este receptor se une de manera específica con la proteína asociada a microtúbulos 1B (MAP-1B), la cual no interactúa con otras subunidades del receptor GABA<sub>A</sub>, esta asociación (GABA<sub>ρ</sub>1-MAP-1B) se ha identificado en las sinapsis de la capa plexiforme interna de la retina y sugiere que tiene un papel importante en la localización subcelular del receptor incorporándolo directamente al citoesqueleto (Hanley et al., 1999). Es interesante que la secuencia consenso que consta de 12 residuos en la última sección del asa intracelular sea aquella que interactúa con MAP-1B y asimismo coincida con la del dominio accesorio MA, lo cual sugiere una compleja asociación proteica que además de conferirle una localización particular al receptor en la célula, también podría potenciar su actividad de permeabilidad iónica conformando un vestíbulo intracelular (Billups et al., 2000). Otras proteínas que se han asociado directamente con este dominio son por ejemplo ZIP3 (Crocì et al., 2003), una variante generada por “*splicing*” alternativo correspondiente a una familia de proteínas que interactúan con la isoforma  $\zeta$  de la proteína cinasa C (PKC- $\zeta$ ), se sabe que esta cinasa modula la respuesta del receptor a través de fosforilaciones que lo internalizan (Kusama et al., 1995; 1998; Filippova et al., 1999). Un caso más es el de la interacción intracelular con la proteína de unión al ácido retinóico, lo cual sugiere un papel nuevo participando como mediador en el control de la expresión de genes neuronales tanto en el cerebro como en la retina (Song et al., 2005).



**Fig. 11.** A, Interacción hidrofóbica entre los residuos que forman el C-terminal del dominio transmembranal 4 (TM4), y el “Cys-loop”. Se resaltan algunos residuos hidrofóbicos (en color rojo) en TM1 (Pro, Leu, Phe, Tyr) que favorecen la interacción entre dominios en a), de tal manera que los residuos Trp 443, Trp 446, y Tyr 448 (en color azul) del C-terminal de TM4 pueden interactuar con el grupo de residuos conservados del “Cys-loop” Phe 135, Pro 136, x (Leu, Met, Phe) 137 (en color verde) en b). B, dominio accesorio a la membrana de los canales iónicos pentaméricos abiertos por ligando, con una esfera representando a un ión estabilizado en el centro. Pons et al., 2004; Unwin, 2005.

### Mecanismo de activación

Actualmente muchos estudios se han enfocado en determinar a las estructuras que enlazan al sitio de unión a ligando y al poro iónico, debido a que la distancia que las separa es de más de 40 Å. Se ha encontrado además que son cuatro asas en el dominio extracelular los elementos más importantes que actúan en forma de un acoplamiento consecutivo que lleva a la apertura y estabilización del canal en ese estado. Estas son, el asa  $\beta$ 1- $\beta$ 2, el “Cys-loop”, la región inmediata anterior a la hélice  $\alpha$  transmembranal TM1 (pre-TM1), y el asa que conecta las hélices  $\alpha$  TM2 y TM3. Su importancia dentro del mecanismo general ha sido también validada a través de distintas técnicas experimentales. La hipótesis más aceptada actualmente propone que la unión del ligando inicia la rotación de una lámina  $\beta$  interna alrededor de un eje que pasa a través del “Cys-loop”. A nivel de la interfase el “Cys-loop” y el asa  $\beta$ 1- $\beta$ 2 son desplazados debido a la rotación de las láminas  $\beta$ 9- $\beta$ 10; el asa 2 y la región pre-M1 se conectan a través de un puente salino formado por Glu 113 en el asa  $\beta$ 1- $\beta$ 2 y Arg 279 en la región pre-M1 (Price et al., 2007). El “Cys-loop” interactúa directamente con el asa que separa a las hélices transmembranales TM2 y TM3, desplazando en este proceso a la hélice TM2, llevando así a la separación de las hélices y distendiendo el cinturón hidrofóbico. Respecto al fenómeno de distorsión en la hélice TM2, los detalles precisos en el reacomodo de todo el dominio son aún poco entendidos. Distintos estudios realizados tanto en los receptores nicotínicos así como a partir de simulaciones dinámicas de las

estructuras homólogas de bacterias (ELIC y GLIC) han sugerido mecanismos que involucran por una parte un giro de toda la hélice (Miyazawa et al., 2003; Unwin, 2005); o bien una inclinación angular como todo un cuerpo rígido (Hilf y Dutzler, 2009); se ha sugerido por último un replegamiento que involucra a las dos propuestas anteriores sin distorsionar dramáticamente la estructura como ocurriría en cualquiera de ellas de manera independiente (Cheng et al., 2009), esto significaría en cambio un movimiento menor y energéticamente más viable. De una u otra manera, una vez ocurrido el canal se encuentra abierto y permite el paso de los iones de un lado al otro de la membrana. Es oportuno, sin embargo enfatizar que todo este fenómeno sólo puede explicarse mediante un mecanismo alostérico que involucra una serie de pasos secuenciales intermediarios, propagados en forma de una “fluctuación conformacional” que son representados en función de un cambio en la relación de energía libre lineal, derivada de las constantes de apertura y cierre del canal, y representadas como un factor cuya pendiente es igual a  $\Phi$  (Cymes et al., 2008; Chang et al., 2009). Se ha probado que los cambios alostéricos ocurren en forma de una red discontinua conformada como una serie de conglomerados cuyas pendientes  $\Phi$  son similares, de tal manera que los residuos encontrados en cada conglomerado influyen de manera similar la apertura del canal. Dicho en otras palabras cada conglomerado se mueve de manera independiente, pero a través de un movimiento común y en el cual todos los residuos se encuentran sincronizados como un bloque. Esto también significa que todos los residuos en un mismo conglomerado están estrechamente acoplados entre sí, y que los cambios conformacionales entre distintos conglomerados están menos estrechamente acoplados entre ellos, de tal manera que el cambio conformacional inducido por la unión del agonista debe propagarse secuencialmente hacia el poro a través de módulos discretos (Lape et al., 2008). Se encontró que al principio de este proceso un par de residuos tienen un papel fundamental Arg 179 y Asp 225, los cuales forman un puente salino interdependiente el cual es estabilizado en ausencia del ligando. Debido a la unión del ligando el puente se rompe dada la extraordinaria movilidad del asa C y esto desencadena mecanismos secuenciales energéticamente acoplados. La región pre-TM1 conecta a la lámina  $\beta$ -10 del asa C con el dominio TM1, la incorporación de esta región acoplando la unión del ligando a la apertura del canal ha sido estudiada utilizando mutagénesis sitio dirigida. Esta región es rica en residuos catiónicos incluyendo a una arginina que está altamente conservada a lo largo de todos los miembros de esta familia proteica, al eliminar la carga de esta arginina se elimina también la función del canal, sin afectar no obstante la unión del ligando, mostrando que este residuo juega un papel crítico acoplando la unión de GABA a la activación del canal. En la interfase extracelular y transmembranal tanto el asa 2 como el “Cys-loop” se encuentran por encima del canal iónico y el asa que conecta a las hélices  $\alpha$  TM2 y TM3; de esta manera el asa 2 puede introducirse en este complejo que forma una bolsa hidrofóbica constituida por los residuos más extracelulares de TM2 de una forma parecida a como se conecta un dispositivo conector a su contacto “*pin-into-socket*” (Kash et al., 2004). Por otra parte, el asa que conecta a las hélices  $\alpha$  TM2 y TM3 es fundamental para realizar este acoplamiento, y su importancia es respaldada por una gran cantidad de estudios realizados durante la última década que se han enfocado en este dominio (Grosman et al., 2000; Hales et al., 2006; Law et al., 2009; O'Shea et al., 2009). Los residuos cargados son críticos para una correcta interacción entre asas que permiten la apertura del canal, de tal manera que se requiere un microambiente electrostático particular para lograr dicha apertura coordinada. Previamente se mencionó una interacción específica que ocurre con el Cys-loop debido a la unión con el ligando y que se genera entre Asp 208 y Lys 342 formando un puente salino que se mantiene estable

mientras la molécula (GABA) se encuentra unida (Xiu et al., 2005), este evento fortalece aún más la teoría de interacción electrostática.

## **HIPÓTESIS**

Es posible predecir importantes dominios de neuroreceptores basados en estudios experimentales efectuados recientemente, como los que se han realizado en el C-terminal del dominio TM4 del neuroreceptor humano GABA $\rho$ 1, así como de otros dominios en el mismo, y éstos pueden ser utilizados para la validación de un modelo estructural de este receptor, que expone las interacciones que allí ocurren para así comprender mejor el impacto que tienen sobre su función, y pronosticando también algunos de los eventos que ocurren durante su activación.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la integridad estructural de un modelo del receptor GABA $\rho$ 1, el cual se generó utilizando estructuras de proteínas homólogas a alta resolución y que fueron empleadas como moldes para su elaboración, para posteriormente contrastarlo con los resultados experimentales realizados mediante distintas aproximaciones metodológicas.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- Generación de un modelo estructural del receptor GABA $\rho$ 1 que pueda ser contrastado con los datos funcionales a la fecha reportados de manera consistente.
- 2.- Identificar los cambios conformacionales necesarios para la activación del receptor ante la unión del ligando usando el modelo anteriormente descrito.
- 3.- Predecir los elementos estructurales que sugieren la participación de componentes no descritos en el dominio TM4, como un nuevo módulo en la activación del receptor.
- 4.- Probar la integridad de este módulo.

## **METODOLOGÍA**

### ***Generación de la estructura secundaria***

Para la generación del modelo se realizaron una serie de alineamientos sistemáticos utilizando la secuencia aminoacídica de GABA  $\rho$ 1 y otros miembros representativos de la familia de receptores “Cys-loop” usando el programa ClustalW (**Fig. 12**) (Larkin et al., 2007), y posteriormente generando un consenso de estructuras similares usando las secuencias reportadas en distintas bases de datos, y que corresponden a subunidades distintivas de la misma familia de proteínas. Este consenso origina un patrón conservado que sirve como base para la predicción de una estructura secundaria común, y que es comparado a su vez con las diferentes estructuras conocidas y reportadas en el Protein Data Bank a través de distintos métodos de resolución ultraestructural, y

asignando un valor arbitrario que indica el grado de conservación del consenso con el programa Jpred (**Fig. 13**) (Cole et al., 2008).

### ***Generación de un archivo PDB***

Se utilizaron tanto la secuencia polipeptídica del receptor silvestre, o bien algunas mutaciones puntuales derivadas de éste, así como los consensos generados a través de los alineamientos expresados en formato FASTA para la realización de modelos por homología a través de una serie de sistemas de ajuste de los esqueletos polipeptídicos respetando parámetros fisicoquímicos de estabilidad, respecto a estructuras conocidas y previamente reportadas en el Protein Data Bank. Estos sistemas utilizan entre otras herramientas una serie de algoritmos conocidos como “*Threading*”, los cuales reconocen la orientación tridimensional de una estructura secundaria ajustándose a un patrón conocido de plegamiento (Levitt, 1983). Los programas y bases de datos utilizadas fueron, 3Djigsaw, CPHmodels, SWISS-MODEL, ESyPred3D, y Geno3D (Bates et al., 2001; Combet et al., 2002; Lambert et al., 2002; Lund et al., 2002; Kiefer et al., 2009). Cada uno de estos programas genera un archivo con extensión .PDB y puede ser representado en programas de visualización molecular, el archivo contiene las coordenadas tridimensionales de la nueva proteína expresada como un monómero, en función de las coordenadas requeridas por la o las proteínas utilizadas como molde. Entonces cada archivo PDB generado corresponde al modelo de sólo una subunidad.

### ***Generación del pentámero***

1.- Se seleccionó uno de los modelos generados por SWISS-MODEL (Swiss Institute of Bioinformatics, University of Basel) que se ajustó mejor a la mayoría de estudios experimentales críticos que han resultado determinantes para la validación funcional del receptor GABA $\rho$ 1. 2.- A partir de esta subunidad, se generaron cinco copias, las cuales fueron montadas considerando una simetría axial que se aplicó en función de las coordenadas tridimensionales del receptor nicotínico de (2BG9) (Unwin, 2005), utilizando el programa UCSF-Chimera (Pettersen et al., 2004), y posteriormente, 3.- armonizadas respecto a la simetría homopentamérica del receptor homólogo de *Gleobacter violaceus* (3EAM) (Bocquet et al., 2009), utilizando el programa ICM-Pro (ICM v3.5 ©, MolSoft L.L.C).

### ***Refinamiento, validación, y representación tridimensional del modelo***

1.- Se realizaron pruebas de minimización energética utilizando el sistema GROMOS96 (parte del software DeepView/Swiss-Pdb Viewer v4.0.1) (Guex y Peitsch, 1997), redefiniendo algunos puntos distorsionados geoméricamente en la estructura cuaternaria considerando la estabilidad termodinámica dada por la interacción entre las cadenas laterales vecinas durante el plegamiento. 2.- Para corregir la orientación y/o distorsión de residuos se utilizaron las herramientas de corrección del programa Swiss-PDBViewer. 3.- El modelo fue posteriormente validado mediante el sistema ProSA-web (Wiederstein y Sippl, 2007). 4.- Para la generación de figuras se utilizó la herramienta de “rasterización” de imágenes del programa PyMOL (PyMOL v0.99 DeLano Scientific LLC software), así como Yasara ® (Krieger et al., 2002).

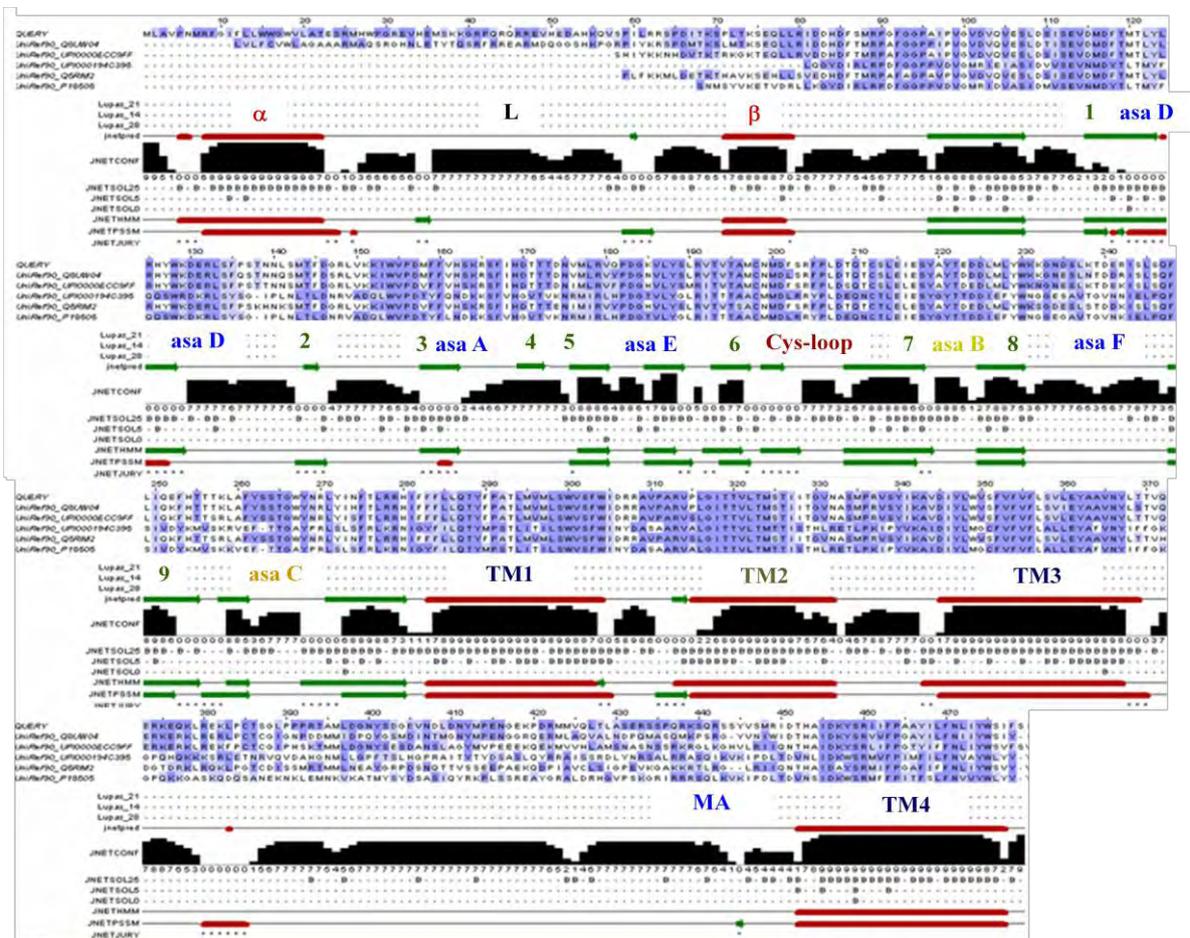


Fig 12. Alineamiento general de secuencias originado en ClustalW

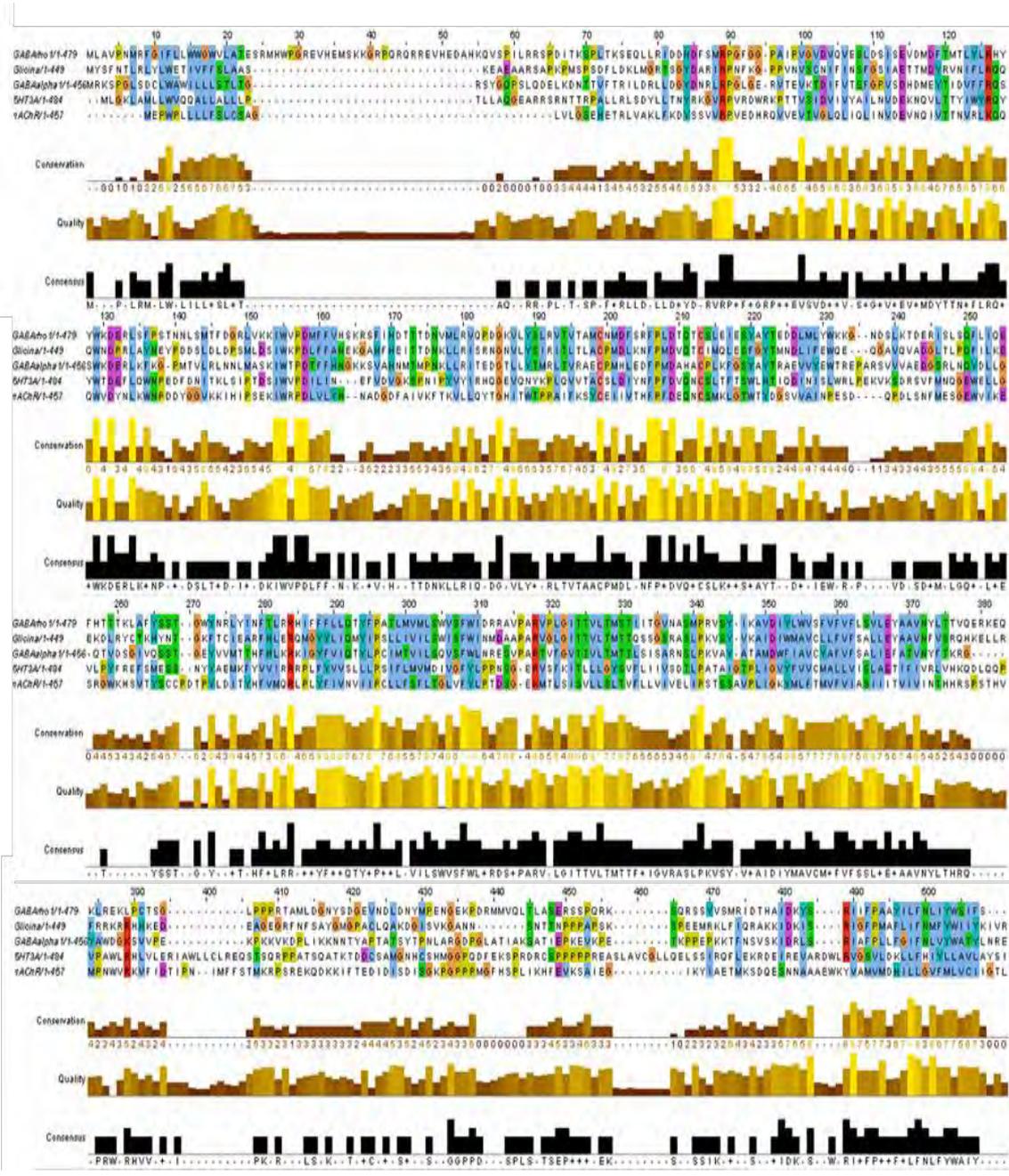


Fig 13. Consenso de dominios generado por Jpred

## RESULTADOS

La longitud del modelo generado en este trabajo fue de 155 Å, correspondiendo a ~80 Å del dominio extracelular, ~40 Å en los dominios transmembranales y ~35 Å del dominio de la hélice asociada a la membrana. La estructura presentó una disposición pseudosimétrica debido a una repetición pentamérica de subunidades  $\rho 1$ . La mayor resolución de la estructura completa es estimada a partir del molde del receptor nicotínico consistente en 4 Å, sin embargo para algunos dominios la resolución puede ser más precisa debido al uso de moldes más refinados. Debido a que el receptor nicotínico fue resuelto en un estado inactivo, el modelo GABA  $\rho 1$  por consiguiente se asocia más a un estado no conductor (cerrado).

Una característica a destacar es que en los alineamientos previos entre subunidades se identificó una diferencia importante en relación a residuos cargados, y cuya polaridad eléctrica es contraria a la existente en el receptor nicotínico, tal es el caso de Arg 313 cuyo papel asociado a la selectividad aniónica será analizado a detalle.

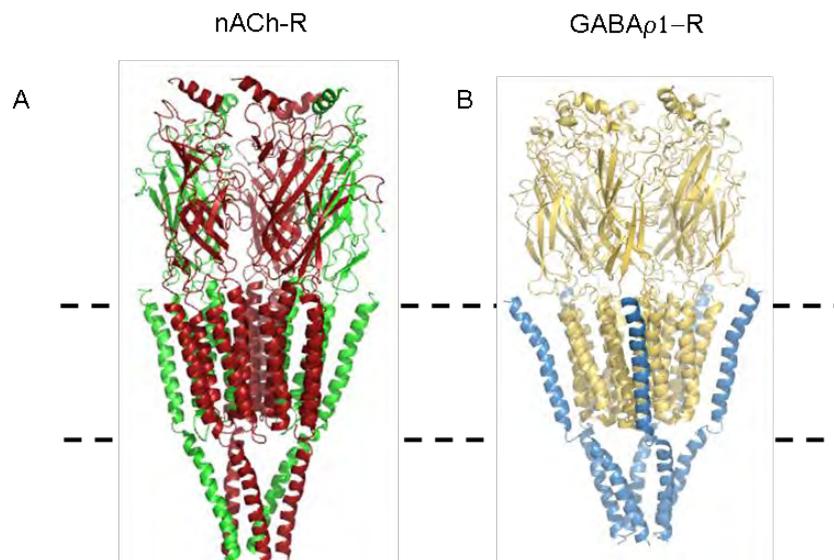
El modelo computacional del receptor GABA $\rho 1$  generado en este estudio proporciona un prototipo compatible con los diferentes datos experimentales que corresponden a distintos dominios del receptor, e incluso con residuos puntuales que por su importancia funcional serán analizados más adelante de manera minuciosa.

### *Alineamientos.*

Los resultados entre alineamientos de las diferentes secuencias que componen esta familia de proteínas muestran una enorme similitud en el patrón básico estructural. Existe una tendencia en ciertos residuos individuales (críticos) a formar patrones comunes correspondientes a dominios conservados (**Fig. 12**). Algunos de estos residuos resultan de gran interés, pues su naturaleza química sugiere una preservación funcional asociada. Las reglas de energía libre que predicen la formación de estructuras secundarias sugieren también que por el alineamiento múltiple los patrones básicos se encuentran homogéneamente distribuidos y altamente conservados (**Fig. 13**). Es necesario destacar sin embargo que existen dominios cuyo índice de conservación disminuye significativamente; un ejemplo es el asa que conecta las  $\alpha$ -hélices transmembranales 3 y 4 (TM3-TM4), cuya longitud es variable y la preservación de la similitud es muy pequeña en las distintas secuencias; asociado a esto la longitud precisa y mayormente el grado de hidrofobicidad de la cuarta  $\alpha$ -hélice transmembranal (TM4) se vuelve también moderadamente variable (**Fig. 13**). El mapa generado por ClustalW muestra algunos de los residuos críticos más importantes conservados en las secuencias representativas de cinco receptores, el receptor GABA $\rho 1$ , el receptor de Glicina, El receptor GABA $\alpha 1$ , el receptor de Serotonina (5HT $_{3A}$ ) y el receptor de Acetilcolina nicotínico (nAChR) (**Fig. 13**); por otra parte el mapa de Jpred incorpora la predicción asociada de estructuras secundarias a la secuencia (**Fig. 12**). En relación a la polaridad de la carga eléctrica podemos identificar diferencias importantes en los residuos asociados tanto al filtro de selectividad estricto en el poro como al patrón de dispersión de cargas en el vestíbulo, y que contrastan entre sí los receptores de selectividad aniónica con respecto a los de selectividad catiónica. Debido a su importancia en las propiedades funcionales del poro cada uno de los elementos anteriormente descritos será retomado posteriormente realizando un análisis más profundo.

### **Generalidades de la estructura cuaternaria.**

A nivel general el receptor nACh resultó ser un molde apropiado para depositar las coordenadas tridimensionales del receptor GABA $\rho$ 1, existen sin embargo particularidades que fue necesario retomar para modelar algunos dominios específicos. Algunas de las más importantes discrepancias entre el modelo GABA $\rho$ 1 y la estructura del receptor nACh consistieron en la longitud y orientación específica en las láminas  $\beta$  que componen el gran dominio N-terminal en el que se encuentra el sitio de unión al ligando. Las láminas  $\beta$ 7,  $\beta$ 9 y  $\beta$ 10 que son fundamentales en la activación del poro y se encuentran limitando tangencialmente al asa C son más pequeñas respecto a las mismas estructuras encontradas en el receptor nicotínico, lo que sugiere que el asa C puede adoptar potencialmente una mayor flexibilidad durante la unión al ligando o a otras moléculas moduladoras (**Fig. 14**). Es notable también que muchas de las asas que conectan las láminas  $\beta$  en el mismo dominio parezcan encontrarse en una disposición un poco menos laxa respecto a sus contrapartes del receptor nicotínico y puede deberse bien a pequeñas divergencias conformacionales del modelo o bien a interacciones específicas guardadas entre el esqueleto polipeptídico o las cadenas laterales de los residuos que las integran con otros residuos en dominios distantes en el pentámero. En el caso de las  $\alpha$ -hélices que conforman los dominios transmembranales la similitud con el receptor nicotínico incrementa significativamente, con excepción del pequeño segmento que conecta a las  $\alpha$ -hélices 2 y 3 (TM2-TM3) justo en el dominio relacionado al filtro de selectividad en que debido a la inclusión de una Prolina (Pro311) en el límite inferior de la hélice, ésta parece extenderse un poco formando un pliegue más rígido que puede asociarse a la orientación que debe tener el residuo cargado con polaridad positiva, en este caso una Arginina (Arg 313) para asegurar su función (**Fig. 14**). Por último, a pesar de ser un poco más especulativa la  $\alpha$ -hélice asociada a la membrana en la región intracelular seguida por la  $\alpha$ -hélice transmembranal 4 (TM4) han mostrado ser consistentes en el impacto que tienen a nivel funcional varios de los residuos pertenecientes a estos dominios, ya que estos últimos son elementos comunes respecto a las estructuras homólogas del receptor nicotínico.

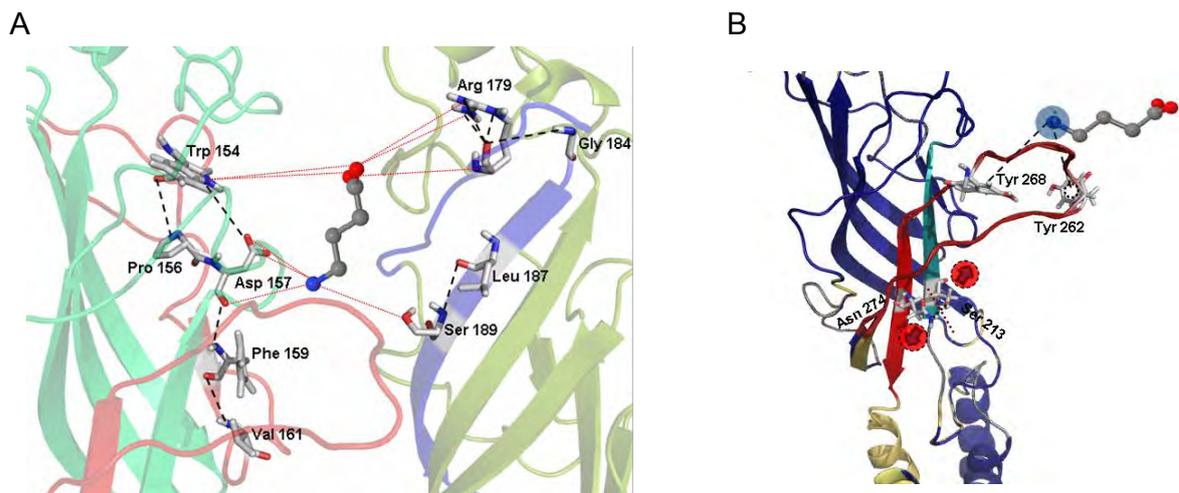


**Fig 14.** Comparación de la estructura del receptor nicotínico, A. (Unwin, 2005.,) en contraste con el modelo de GABA $\rho$ 1, B.



## Asa C

El asa C en el modelo de GABA  $\rho 1$  presenta una discrepancia interesante respecto a la estructura homóloga del receptor nACh (Unwin, 2005). En este último su longitud es 35% menor respecto al modelo. En ambos casos dicha asa se encuentra flanqueada por las láminas  $\beta$ -9 y  $\beta$ -10 que conforman estructuras moderadamente rígidas; ambas láminas son por consiguiente menores en el modelo y de esta manera la estructura adoptada se adiciona como parte del asa sugiriendo así que adquiere una conformación más flexible (**Fig. 16B**). Se puede identificar también un puente de hidrógeno formado por dos residuos entre las láminas  $\beta$ -7 y  $\beta$ -10 (Ser 213  $\beta$ -7, Asn 274  $\beta$ -10), mismo que se rompe como parte del desplazamiento del asa C debido a la unión del ligando (**Fig. 16B**). En el asa C se encuentran también los residuos Tyr 262 y Tyr 268, que estabilizan el extremo amino de GABA como parte del sitio de unión al ligando; respecto a lo anterior se piensa que este dominio debe tener cierto movimiento significativamente mayor respecto a otros dominios de la proteína; este movimiento es el inicio de distintos plegamientos internos que desencadenan los cambios conformacionales en la proteína que llevan a la distorsión estructural del poro y al paso de los iones a través de la membrana (**Fig. 16B**).



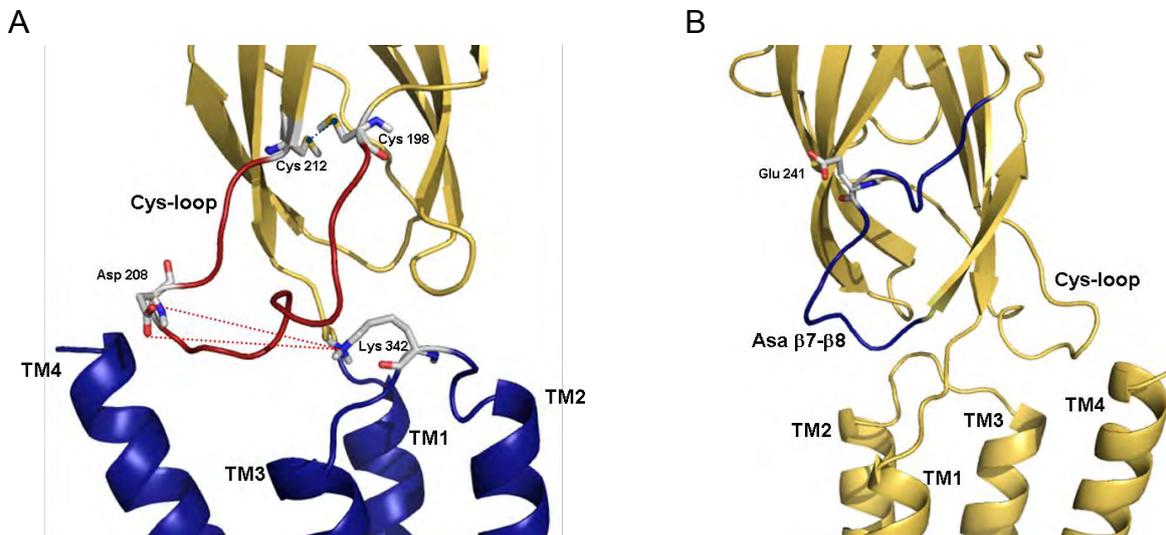
**Fig 16.** Representación de los residuos críticos que participan en el reconocimiento del ligando en el asa C y algunos dominios asociados. A, residuos que participan en el reconocimiento de GABA para estabilizar la molécula en el sitio de unión al ligando. B, identificación de los residuos críticos que actúan en sincronía durante los primeros eventos durante la unión del ligando, a nivel del asa C y las láminas beta 7 y 10 asociadas a ésta.

### “Cys-loop”

A diferencia del asa C, la posición y distribución del “Cys-loop” es bastante similar entre el modelo y la estructura reportada del receptor nACh. En los alineamientos es también uno de los segmentos con mayor similitud en toda la familia de receptores (excepto en las estructuras homólogas de bacterias), lo cual alude a una importante función asociada. Cerca del punto intermedio del asa se encuentran tres residuos críticos, Pro 206, Leu 207, y Asp 208 que conforman un consenso altamente conservado (Px<sub>x</sub>D, donde x representa a un residuo hidrofóbico, típicamente Leu, Met o Phe). La correlación de estructuras en otros modelos es también uno de los puntos que vale la pena destacar, debido al ángulo diédrico de la prolina y a que ésta está asociada a otro residuo hidrofóbico que parece conformar un “repliegue hidrofóbico” cerca de la mitad del asa (**Fig. 17A**), lo cual ocurre en todos los miembros de la familia; los residuos involucrados con este repliegue en la interfase extracelular-transmembranal del receptor serán retomados posteriormente como elementos de discusión.

### Asa $\beta 8$ - $\beta 9$

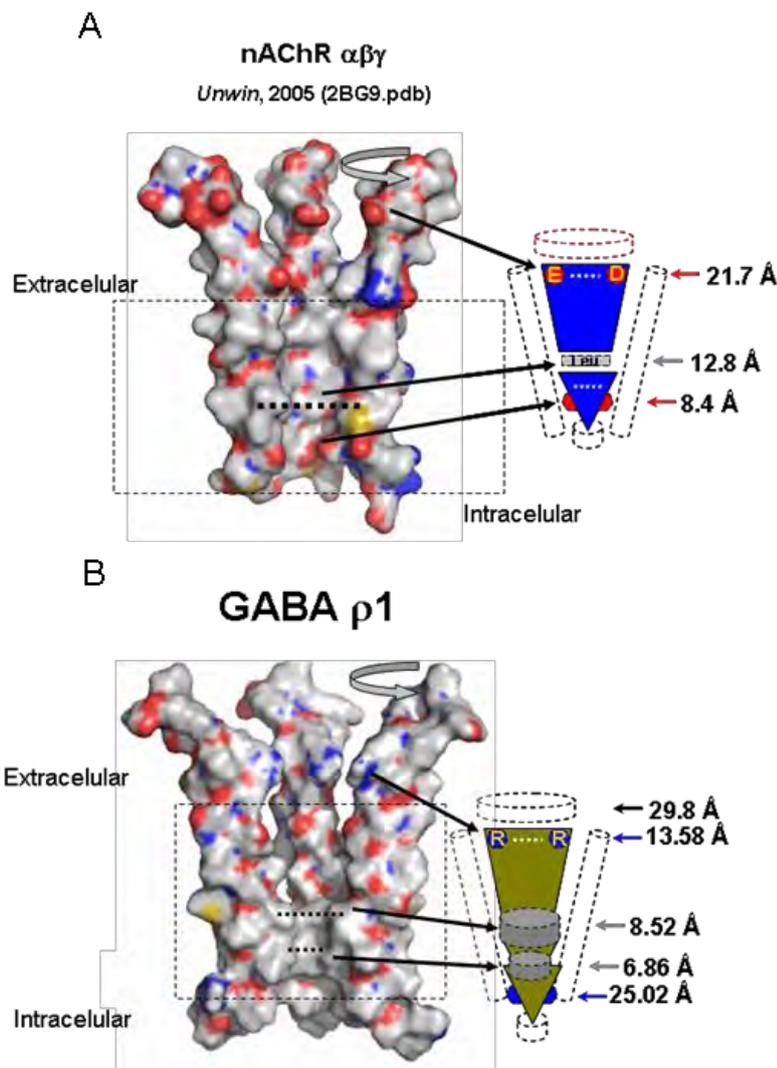
Poco se puede elucidar aún acerca de este dominio, excepto que guarda también similitud significativa con el receptor nACh, y que el glutamato conservado (en este caso Glu 241) se puede identificar con gran detalle (**Fig. 17B**).



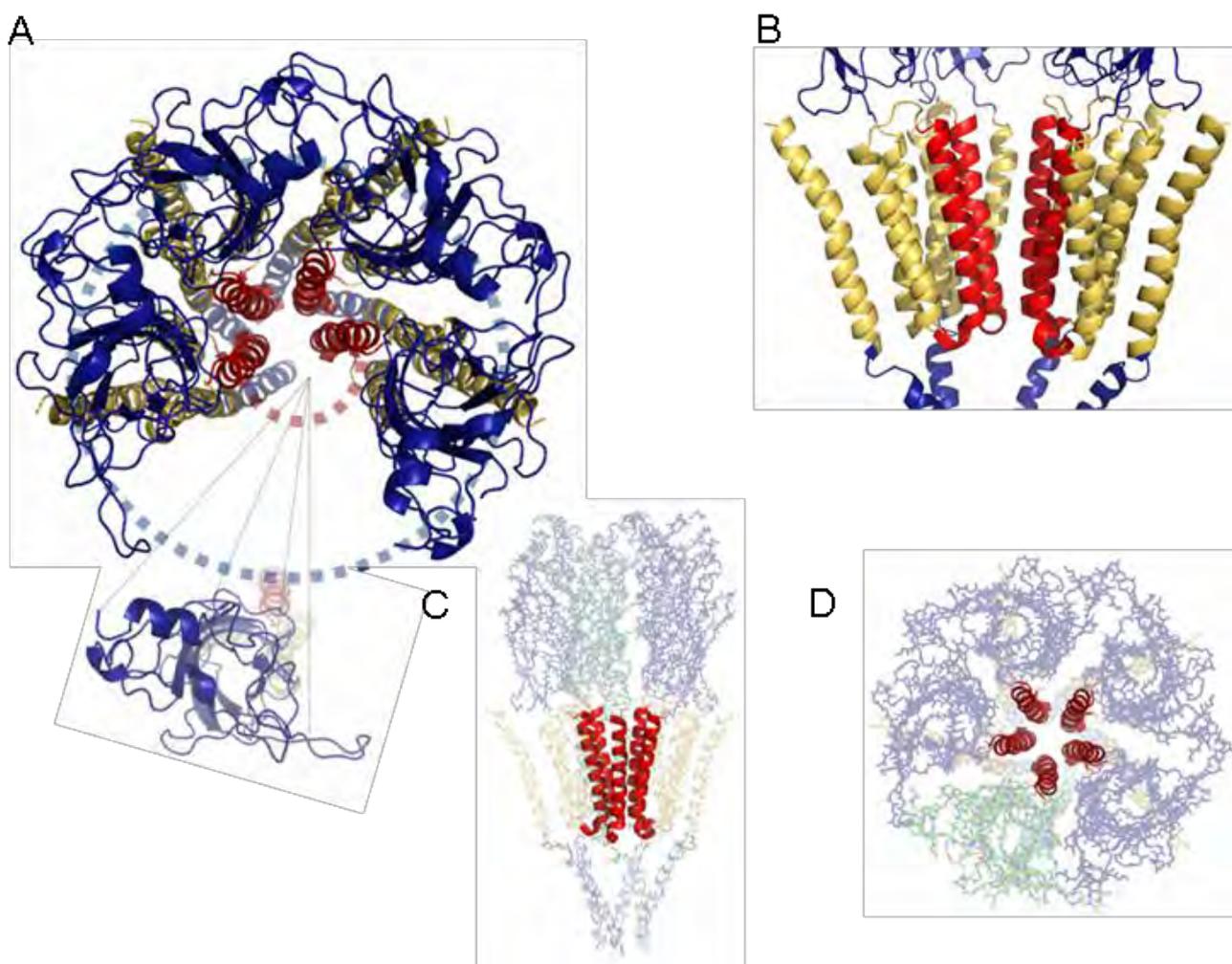
**Fig 17.** Representación de los dominios “Cys-loop” y el asa  $\beta 7$ - $\beta 8$ . A, dominios de interacción en la interfase (“Cys-loop”) y asa TM2-TM3, así como los residuos más importantes que participan en la constitución de puentes salinos transitorios durante la activación del receptor. B, identificación del asa  $\beta 7$ - $\beta 8$ , cuya participación ha sido discutida en la activación del receptor, aunque su función exacta aún sigue siendo poco entendida.

### *Dominio transmembranal TM2 (región del poro)*

A pesar de que en todos los receptores de esta familia el dominio de poro se genera por el ajuste de los TM2 en la parte central de la proteína, al comparar los poros mismos resultan bastante distintos. El elemento más evidente es la distribución de las cargas, mientras que en el receptor nACh las cargas negativas se distribuyen en ambos extremos del poro, la distribución cambia en el modelo del receptor GABA  $\rho$ 1; parece existir una dispersión de cargas positivas en la parte superior del mismo conformando un primer vestíbulo, mientras que en la región más interna hay una Arginina (Arg 313) cuya orientación se ha mostrado que puede cambiar dada la activación del receptor y a la reestructuración del poro (**Fig. 18**). En este caso la carga importante del residuo aunada a la restricción estérica en el estado activo promueve una fuerte selectividad aniónica. Se forman pues dos vestíbulos que deben estar hidratados la mayor parte del tiempo; éstos son un poco mayores en el receptor nicotínico respecto al de GABA  $\rho$ 1 (**Fig. 18**). En ambos casos los vestíbulos son potenciales depósitos de iones y se pueden asociar a las diferencias particulares que ocurren entre las cinéticas de respuesta para los distintos canales iónicos (**Fig. 19**).



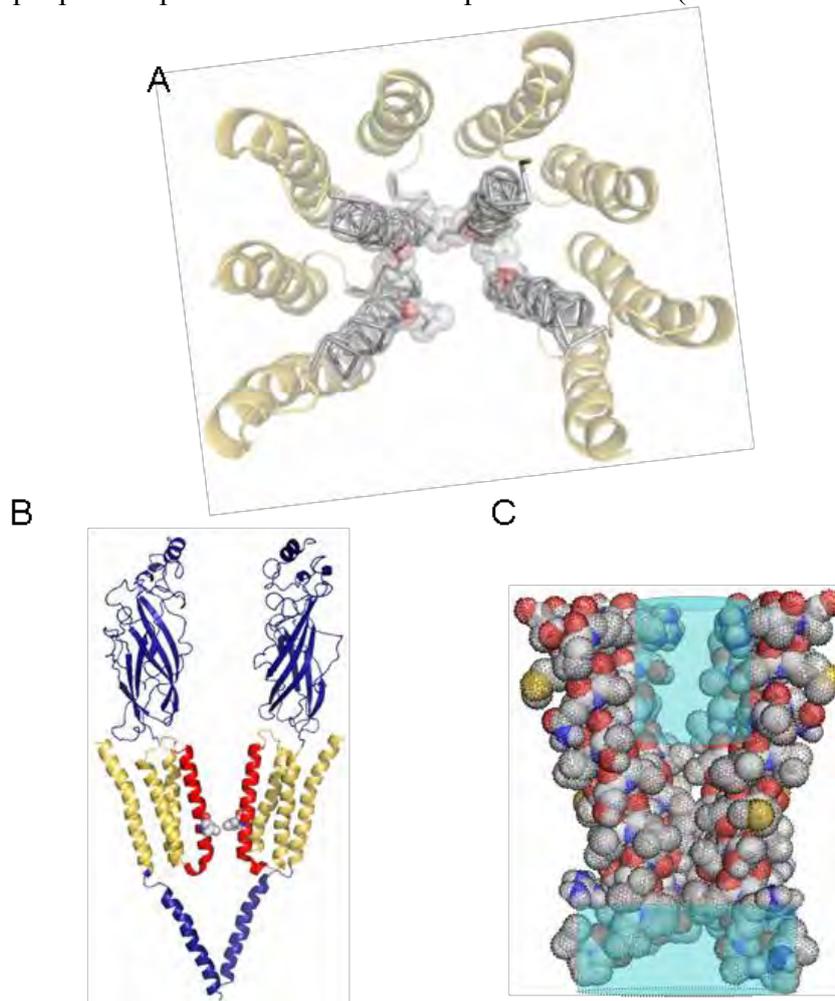
**Fig 18.** Esquema de comparación de los dominios de poro del receptor nicotínico y el correspondiente del modelo de GABA $\rho$ 1. Las figuras representan un mapa electrostático de los poros respectivos, los grupos carboxilo (en color rojo) contrastan con los grupos amino (en color azul). Las geometrías sugieren una mayor constricción en el poro del receptor GABA $\rho$ 1.



**Fig 19.** Esquema del dominio de poro resaltado (en color rojo) en diferentes configuraciones en el canal pentamérico abierto por ligando. A, en una conformación dextrahelicoidal paralela al plano de la membrana, separando a una de las subunidades del conglomerado. B, en una conformación perpendicular al plano de la membrana. C, y D, pentámeros completos.

## Compuerta

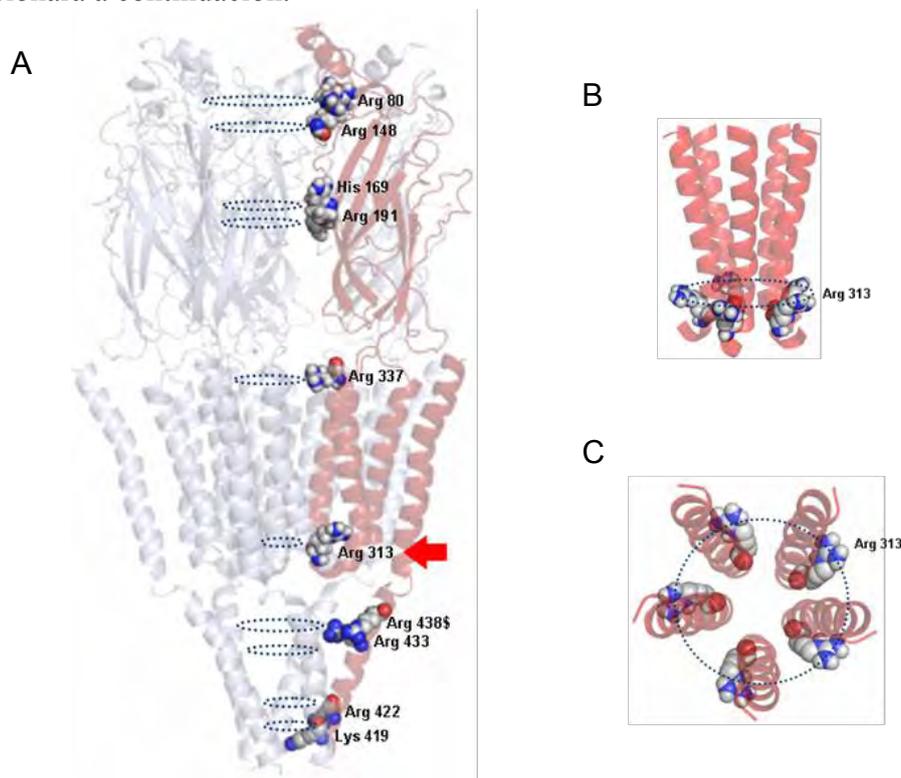
En el dominio de compuerta, o la barrera energética conferida por residuos hidrofóbicos a la mitad del poro, se identificó una leucina (Leu 322) como el residuo más importante que coincide con la posición equivalente en el nACh (**Fig. 20A, B**); sin embargo cuando en este último es el principal y único residuo asociado a la compuerta, en el receptor GABA  $\rho 1$  parecen estar asociados algunos otros residuos, como Val 321 y Met 324, que pueden en pequeña magnitud aumentar la barrera energética y así también extender la compuerta en dirección al interior de la membrana (**Fig. 20C**). El radio de hidratación también disminuye lo cual coincide con los estudios realizados con el tamaño de moléculas que pueden permear a través de los poros aniónicos (Haddadian et al., 2008).



**Fig 20.** Dominio de compuerta. A, esquema del efecto de los residuos hidrofóbicos que juegan el papel de barrera energética o compuerta que impide el paso de los iones en el estado no conductor del canal, en una representación del poro en un plano paralelo a la membrana plasmática. B, esquema de dos subunidades en un plano perpendicular a la membrana identificando el dominio de poro (en color rojo) embebido en los dominios transmembranales (color amarillo), respecto a los dominios intra y extracelulares (color azul). El residuo hidrofóbico más importante relacionado con la compuerta (Leu 322) se resalta también en la parte central del dominio de poro. C, esquema de la densidad electrónica y el efecto de barrera estérica que juegan los residuos hidrofóbicos a la mitad del dominio de poro. Se pueden generar dos vestíbulos llenos de agua en ambos extremos del poro y separados entre sí por la compuerta hidrofóbica.

## *Filtro de selectividad*

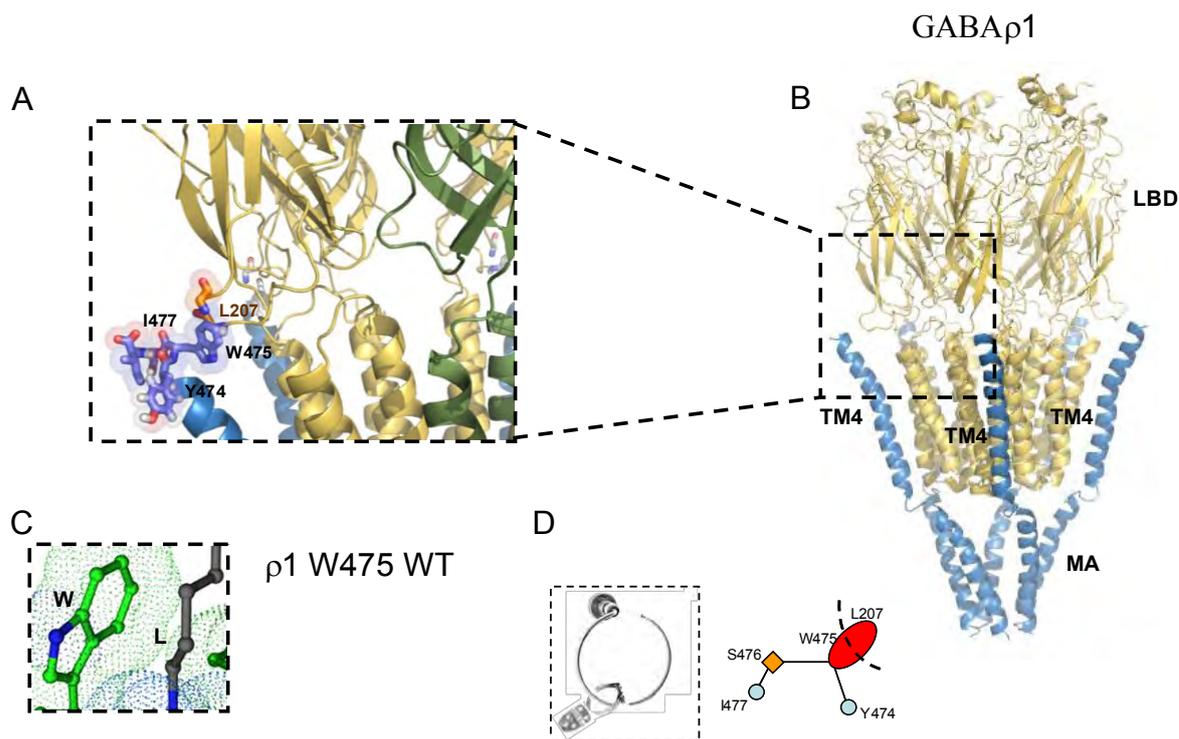
El filtro de selectividad en los canales aniónicos de la familia de receptores pentaméricos activados por ligando parece ser una marca distintiva que los pone en contraste respecto a los canales catiónicos (**Fig. 21A**). Mientras que en estos últimos existe un consenso que incluye a los residuos Gly-Glu-x (siendo x un residuo con polaridad positiva, Arginina o Lisina), en las posiciones -3,-2,-1 de acuerdo a la nomenclatura Universal del poro, en los canales aniónicos tanto en otras subunidades del receptor GABA<sub>A</sub>, como en el receptor de Glicina el consenso es Pro-Ala-Arg. El residuo glutámico tendría el papel del filtro en los canales catiónicos, mientras que la arginina por su parte lo haría con los aniónicos. Debido a que el receptor nicotínico fue resuelto en un estado no conductor y éste se utilizó como molde, la orientación del residuo glutámico ligeramente distante y orientado ~15° de manera dextrorhelicoidal sugiere una posición similar para su contraparte (Arg 313) (**Fig. 21B, C**). Sin embargo, como se destacó previamente, es evidente en este punto la diferencia pues la posición de la prolina (Pro 311) y la flexibilidad de la alanina (Ala 312) modifican la hélice en su inclinación hacia el extremo intracelular. La posición adquirida al momento de la activación debe orientar a Arg 313 al interior del poro; esa posición puede mantenerse precisamente por la rigidez de la prolina que actúa como un sujetador, y la flexibilidad de la alanina, que actúa como bisagra. Un caso similar ocurre en el dominio TM4 el cual se mencionará a continuación.



**Fig. 21.** Filtro de selectividad. A, residuos en el modelo de GABA $\rho$ 1 cuya disposición accesible al solvente y polaridad eléctrica los convierte en elementos importantes para la selectividad aniónica. La flecha representa el filtro de selectividad estricto en el dominio de poro. B y C, diferentes disposiciones representando al filtro de selectividad en el poro, la orientación se modifica ante la distorsión estructural que éste experimenta debido a los cambios conformacionales inducidos por la unión del ligando.

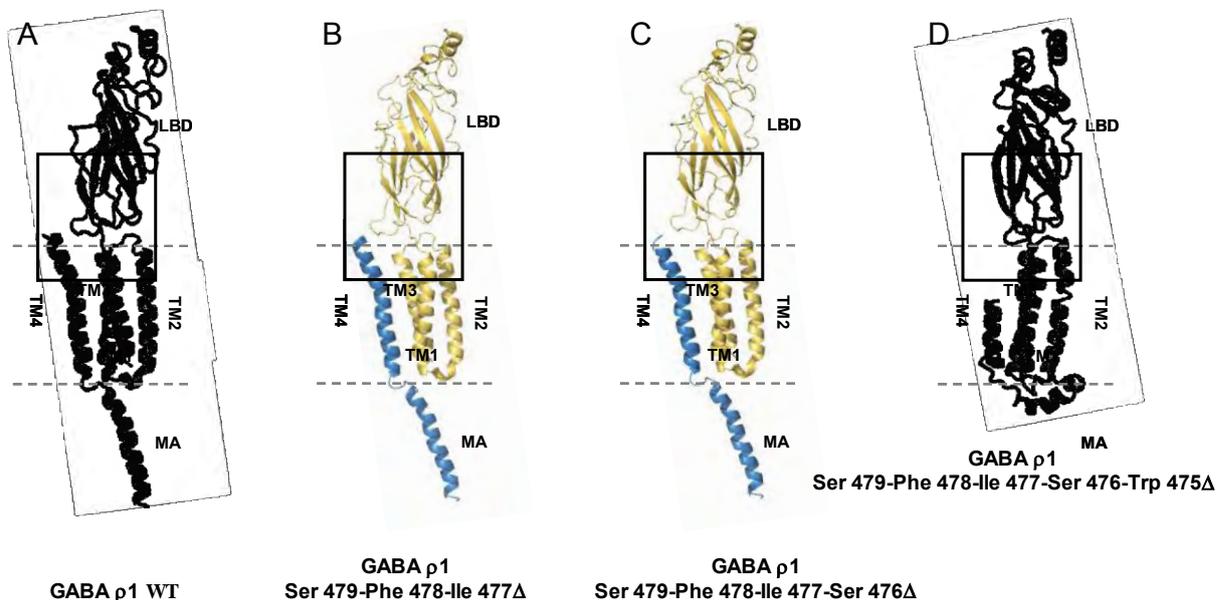
### *Dominio transmembranal TM4*

La  $\alpha$ -hélice transmembranal 4 (TM4) es el dominio más hidrofóbico de toda la proteína; una de sus características principales es que hacia el extremo C-terminal, casi en el límite extracelular de la membrana, se encuentran altamente conservados un residuo aromático (tirosina o fenilalanina) seguido por un residuo altamente hidrofóbico (triptofano, leucina o metionina); la disposición tridimensional de este segmento lo sitúa justamente en la interfase que comunica con el dominio amino terminal, muy cerca del “Cys-loop” (**Fig. 22B**) que también contiene un residuo hidrofóbico y que lleva a este último a formar un “repliegue” a la mitad del asa. Se ha probado que el residuo Tyr 474 así como Ile 477 interactúan de tal manera que crean una especie de sujetador conformacional (**Fig. 22A, D**). La orientación de los residuos en la hélice del modelo del receptor GABA $\rho$ 1 tiene una disposición tal que Tyr 474 e Ile 477 siendo hidrofóbicos se orientan en el plano de la membrana, y Ser 476 polar, reactivo, y con bajo índice estérico actúa como una bisagra que deja expuesto a Trp 475 para interactuar de manera hidrofóbica con Leu 207 (**Fig. 22C, D**) en el “Cys-loop”, que a su vez se orienta por la rígida posición que ocupa en el asa debido al ángulo diédrico conferido por Pro 206, ambos como parte del consenso extraordinariamente conservado (PxD) mencionado previamente.



**Fig 22.** A, detalle de las interacciones hidrofóbicas que ocurren en el dominio TM4 y el “Cys-loop”, que por su orientación y su geometría juegan un papel importante durante el mecanismo de activación; aparecen representados los residuos específicos de TM4 (en color azul); que interactúan con una leucina (en color amarillo) en el Cys-loop. B, esquema de la interfase entre la membrana y el residuo extracelular respecto al receptor completo. C, detalle de la interacción hidrofóbica planar entre Trp 475 y Leu 207. D, Las argollas representan un mecanismo de contención conformacional entre el C-terminal de TM4 como sujetador y el Cys-loop siendo restringido. Cada residuo crítico es identificado, los soportes del sujetador (en color azul pálido), la bisagra (en color amarillo), y los puntos de interacción entre sujetador y asa (en color rojo).

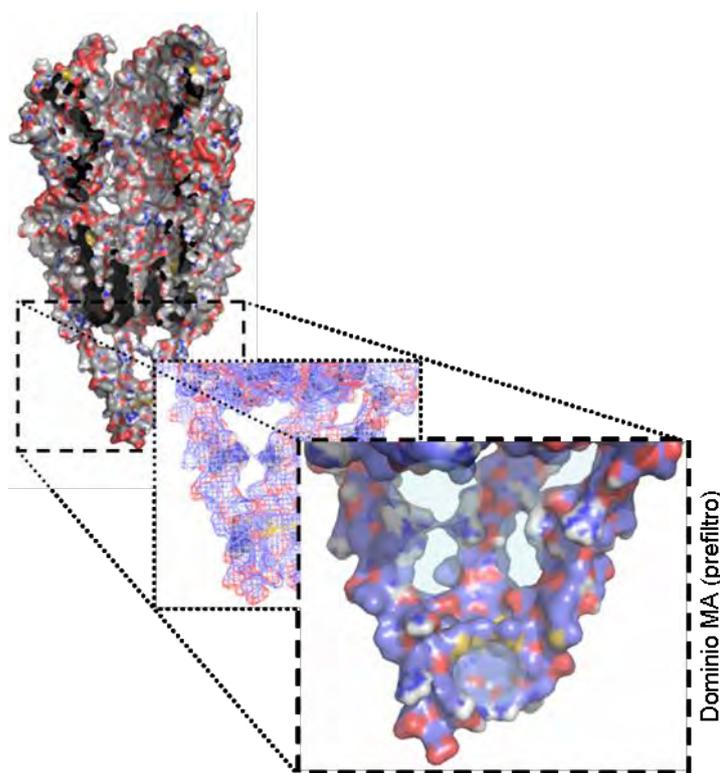
Para entender mejor esta interacción nosotros realizamos una serie de modelos basados en un estudio que elimina consecutivamente los últimos cinco residuos del dominio TM4 (Reyes-Ruíz et al., 2010) y encontramos una distorsión dramática en la delección de Ser 479-Phe 478-Ile 477-Ser 476-Trp 475 $\Delta$  no sólo para este dominio, sino en toda la subunidad embebida en la membrana, lo cual sugiere que esta delección impacta seriamente en su arquitectura y como consecuencia en la estabilidad de toda la proteína así como en su función asociada (**Fig. 23**). Con base en lo anterior, y debido a la importancia de dicha posición en la arquitectura de la proteína, realizamos para este trabajo varias mutaciones puntuales *in silico* (Trp 475Ala, Trp 475Asp, Trp 475Phe, Trp 475Gly, Trp 475Leu, Trp 475Arg, Trp 475 $\Delta$ ), así como la eliminación de los residuos inmediatos anterior y posterior en la secuencia polipeptídica (Tyr 474 $\Delta$ , Ser 476 $\Delta$ ) en el modelo del receptor GABA $\rho$ 1 (**Fig. 24**). En el análisis de estas estructuras encontramos que el segmento comprendido entre los residuos Tyr 474, Trp 475, Ser 476, Ile 477 que preservan la arquitectura estable de la hélice se disponen conformando una estructura triangular elástica, parecida a un gancho en la interfase extracelular, de manera que las cadenas laterales de Tyr 474 e Ile 477 se orientan hacia la región hidrofóbica en la membrana, mientras que Trp 475 parece orientarse hacia el gran dominio N-terminal, de tal manera que por su cercanía a Leu 207, localizado en la parte media del Cys-loop (**Fig. 24**), originan una interacción por fuerzas hidrofóbicas; esta interacción justificaría en gran medida tanto los experimentos realizados hasta la fecha en este dominio estructuralmente conservado en la familia de receptores, así como su importante papel en la secuencia conformacional que lleva a la distorsión del poro y a la permeabilidad iónica debido a que mantiene estable la disposición accesible al ligando del receptor al mantener sujetos a los dominios Cys-loop en el estado no conductor mediante interacciones hidrofóbicas (**Fig. 24**).



**Fig. 23.** Comparación de los modelos de las delecciones seriales del C-terminal de una subunidad GABA $\rho$ 1. A, subunidad silvestre (WT). B, Ser 479-Phe 478-Ile 477 $\Delta$ . C, Ser 479-Phe 478-Ile 477-Ser $\Delta$ . D, Ser 479-Phe 478-Ile 477-Ser 476-Trp 475 $\Delta$ . El recuadro resalta la interacción en la interfase extracelular-transmembranal.

### *Asa intracelular TM3-TM4 (dominio accesorio MA)*

En el modelo del receptor GABA $\rho$ 1 se pueden identificar algunos residuos con carga positiva, tales como argininas y lisinas (Lys 419, Arg 422, Arg 433, Arg 438) cuya orientación sugiere que son elementos que promueven una preselectividad iónica (**Fig. 25**) que puede potenciar los efectos del filtro de selectividad estricto (**Fig. 21A**). Al analizar dichas posiciones en los alineamientos no coinciden del todo respecto a las posiciones de aquellos residuos cuya polaridad de carga pudiese dirigir parcialmente a un ión a través del poro de otros canales iónicos pentaméricos activados por ligando, tanto canales catiónicos como aniónicos, y es debido a que es precisamente el dominio en donde la conservación de la similitud es menor. Sin embargo debe aplicarse el mismo rigor de análisis en cada uno de estos receptores de manera individual para valorar la posible orientación que tienen respectivamente, tanto en las cadenas laterales de los residuos integrales una vez modelados o incluso resueltos estructuralmente por alguna metodología experimental como lo es la cristalografía por rayos X, o la Resonancia Magnética Nuclear para poder aseverar por completo dicha posibilidad antes de generalizarla. Otro problema aún por resolver es identificar con toda claridad las estructuras remanentes que deben ser también importantes para las múltiples funciones que cumple esta proteína en la membrana además de la permeabilidad iónica, ya sea de manera independiente o bien en complejos con las distintas proteínas con las que se asocia en la membrana y el citoplasma circundante.



**Fig. 25.** Representación de la geometría y de los residuos críticos cuya polaridad eléctrica puede influir en la preselección intracelular de aniones en el dominio accesorio a la membrana (MA) del receptor GABA $\rho$ 1. La orientación de los grupos amino (en color azul) de estos residuos (argininas y lisinas) expuestos al solvente sugiere fuertemente su participación funcional.

## DISCUSIÓN

El presente estudio resalta algunos de los elementos funcionales de distintos dominios del receptor GABA $\rho$ 1, los cuales fortalecen la validez de un modelo estructural que pretende representar e integrar muchos de los experimentos electrofisiológicos realizados a la fecha en este receptor. Otra de las metas fue identificar los elementos clave involucrados en la activación del receptor, es decir de los eventos asociados como parte de una “fluctuación conformacional global” que lleva a la apertura del poro y al paso de los iones de un lado a otro de la membrana. Aunque a lo largo de esta discusión se retomarán muchos de estos eventos para analizarlos detalladamente podemos enumerarlos secuencialmente como diez sucesos puntuales concatenados temporal y espacialmente de la siguiente manera.

- 1.- La unión de ligando. Aunque muchos residuos están asociados de manera inespecífica con el reconocimiento de GABA se han identificado de manera fundamental a los residuos Tyr 219, Tyr 221, Tyr 262 y Tyr 268, en la subunidad principal (+); y Arg 125 y Ser 189 en la subunidad accesoria (-).
- 2.- El desplazamiento asociado inducido por la unión al ligando del asa C y el asa B en dirección al extremo amino de éste, en función de la orientación de GABA como parte del proceso de interacción *cación- $\pi$* .
- 3.- La formación de un puente salino en el dominio amino de interfase entre dos subunidades, conformado por los residuos Asp 225 en la subunidad principal (+) y Arg 179 en la subunidad accesoria (-), generada por el desplazamiento de las asas antes mencionadas.
- 4.- El acoplamiento y desplazamiento distal antiparalelo de las láminas  $\beta$ -7,  $\beta$ -9, y  $\beta$ -10.
- 5.- La ruptura de un puente salino formado entre Ser 213 en la lámina  $\beta$ -7 y Asn 274 en la lámina  $\beta$ -10 ante el desplazamiento de estas últimas.
- 6.- La ruptura de un puente salino formado entre Lys 342 (localizada en el asa TM2-TM3) y Glu 113 (localizado en el asa  $\beta$ -1- $\beta$ -2) debido a la interacción tangencial asociada a manera de pivote con las láminas  $\beta$ -7,  $\beta$ -9 y  $\beta$ -13, y la interfase con la membrana.
- 7.- La formación de un puente salino transitorio entre Arg 279 en la sección previa inmediata a la  $\alpha$ -hélice transmembranal 1 (Pre-TM1) y Glu 113 en el asa  $\beta$ -1- $\beta$ -2, asociado a la estabilización polar de este último residuo por la ruptura del puente salino mencionado anteriormente.
- 8.- El desacoplamiento hidrofóbico entre los residuos Trp 475 (localizado en la  $\alpha$ -hélice transmembranal 4, TM4) y Leu 207 (localizada en el “Cys-loop”), y el desplazamiento asociado de “Cys-loop” en la interfase anfífilica de la membrana y la región extracelular debido a la interacción dipolo-dipolo entre Asp 208 en el “Cys-loop” y Lys 342 en el asa TM2-TM3, a su vez para su estabilización.
- 9.- La formación de un puente salino transitorio entre Lys 342 en el asa TM2-TM3 y Asp 208 en el “Cys-loop”.
- 10.- El desplazamiento asociado de la  $\alpha$ -hélice transmembranal 2 (TM2), o dominio de poro, como parte de la interacción polar anterior y la consecuente modificación en la permeabilidad iónica a través de la membrana (**Fig. 26**).

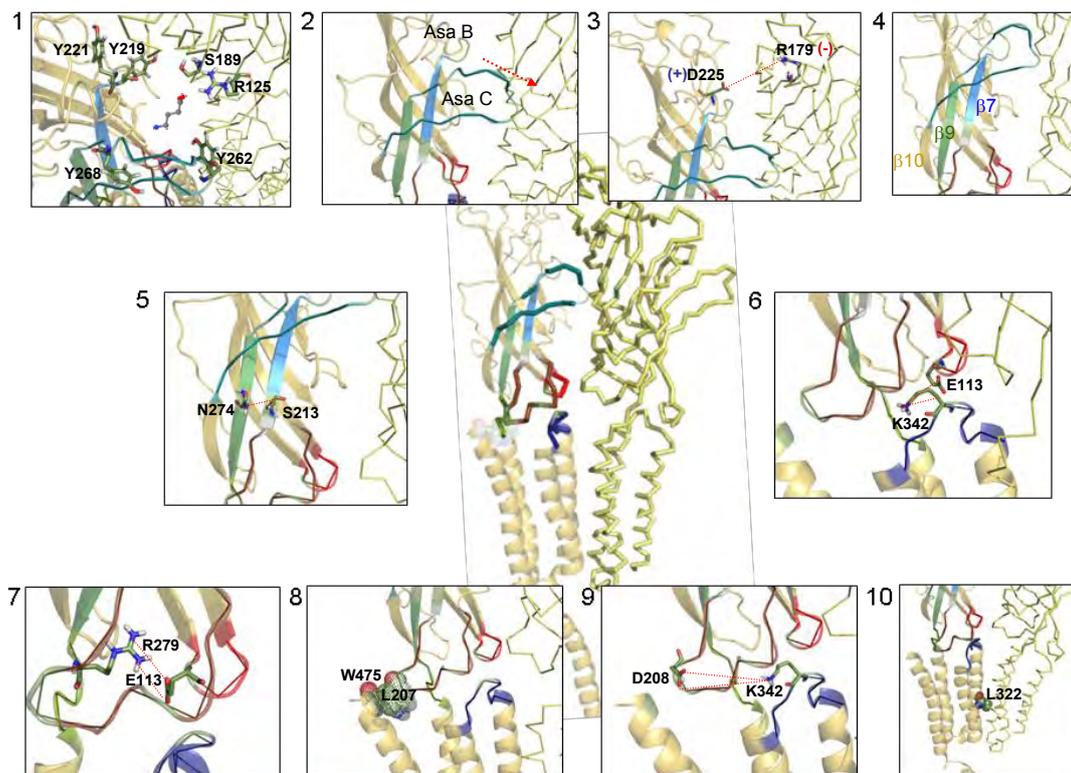
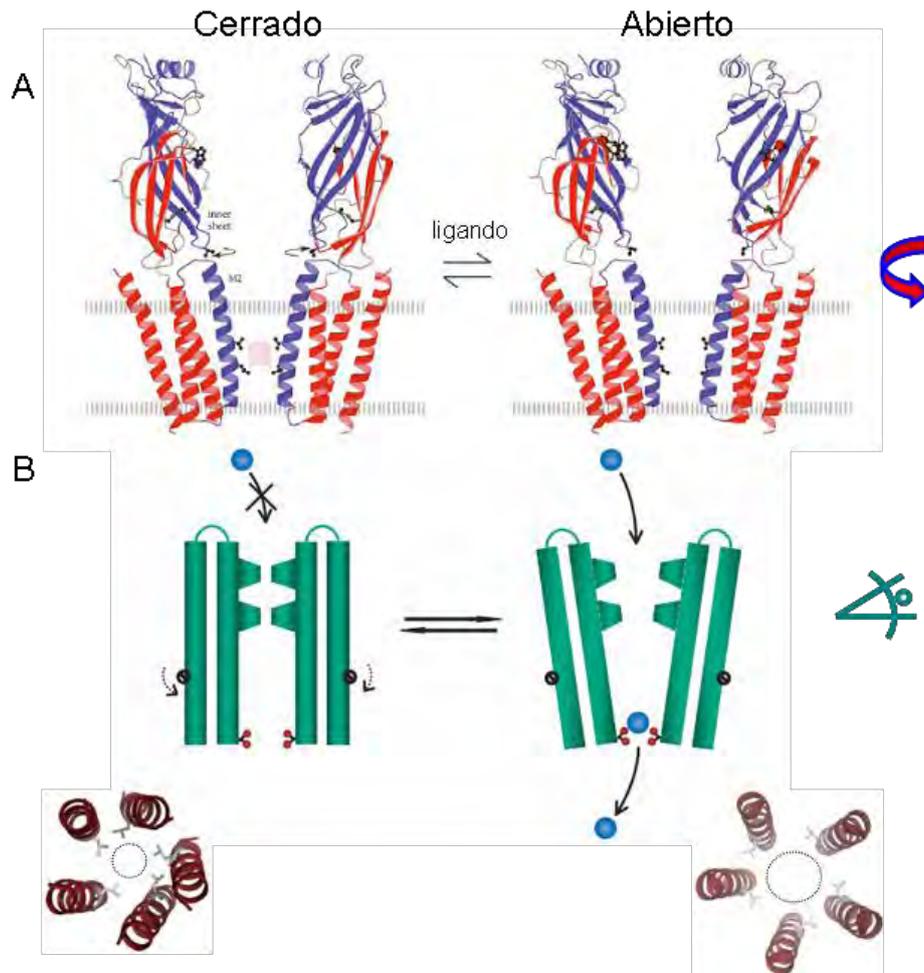


Fig. 26 Secuencia de eventos en la activación del neuroreceptor

Recientemente se ha propuesto que el dominio de poro en lugar de rotar como se había planteado previamente (Miyazawa et al., 2003; Unwin, 2005) parece que se inclina de manera sincronizada ante la secuencia de eventos anteriormente descritos. Dicha propuesta sugiere que TM2 y TM3 se mueven en conjunto como un cuerpo rígido (Hilf y Dutzler, 2009) en la transición de apertura con un movimiento total de  $12^\circ$  perpendicularmente al plano del poro en la membrana, mientras que entre estas  $\alpha$ -hélices la variación máxima es menor a  $1.7^\circ$ . En contraste, el ángulo formado entre TM1 y TM2, o TM1 y TM3 varía alrededor de  $8^\circ$  durante la transición (Zhu y Hummer, 2009). La magnitud en la rotación para cada hélice se ha calculado no mayor a  $6^\circ$ , la cual es más bien pequeña para justificar el mecanismo de apertura (Cheng et al., 2009). Aunado a esto se había propuesto previamente, realizando mutaciones puntuales sistemáticas en el dominio de poro, introduciendo residuos ionizables (Cymes y Grosman, 2005; 2008), que los cambios conformacionales asociados al mecanismo de activación consistían en un reacomodo sutil, un cambio adecuado considerando la rápida cinética de apertura-cierre del canal inducida por el ligando que presenta esta familia de receptores (Fig. 27).



**Fig 27.** Diferentes propuestas de apertura de un canal iónico pentamérico abierto por ligando. A, rotación sincronizada de la  $\alpha$ -hélice TM2. B, inclinación perpendicular de 12 grados respecto al plano del poro en la membrana. Miyazawa et al., 2003; Unwin, 2005; Hilf y Dutzler, 2009.

Al recapitular en los elementos que son capaces de modular de manera alostérica al receptor y cómo podrían impactar éstos elementos en el modelo encontramos que el pH puede modificar la respuesta significativamente, de tal manera que al llevarlo a niveles más alcalinos que el pH fisiológico (un cambio en el pH de 7.4 a 8.4), la respuesta incrementa significativamente (hasta un  $124 \pm 4\%$  del valor total); mientras que a niveles ácidos (un cambio en el pH de 7.4 a 6.4) disminuye aún en mayor proporción (hasta un  $52 \pm 5\%$  del valor original) (Huang y Dillon, 1999; Rivera et al., 2000). Si bien es cierto que el pH podría modificar la estructura zwitteriónica de GABA hidratado a distintos conformeros menos estables pero más reactivos en el sitio de unión al ligando, el cambio también puede aplicarse al dominio mismo a través de cambios en el pKa de los residuos críticos, y se puede extender de manera inespecífica a todo el vestíbulo extracelular pues en gran medida éste se encuentra expuesto al solvente (Carrier et al., 2002). Los cambios inducidos por acidez disminuyen potencialmente la afinidad de unión de tipo *cación- $\pi$*  (Lummiss et al., 2005) en los residuos aromáticos aumentando la estabilidad del estado protonado en el extremo carboxilo de GABA, y el efecto contrario ocurre en la inducción generada a valores alcalinos. Otra explicación sugiere que la modificación global en el pKa de los residuos cargados con polaridad positiva en el vestíbulo externo (extracelular) promueve una disminución en su afinidad por aniones ante valores de pH ácido, disminuyendo también la formación de enlaces generados por los electrones libres (Nagy et al., 1997; Carrier et al., 2002); el mismo caso se puede extrapolar a los dominios relacionados con el filtro de selectividad en el poro modificando las propiedades normales de permeabilidad una vez que el receptor fue activado (Nonner et al., 1998).

Respecto al bloqueo ejercido por  $Zn^{2+}$  (Wang et al., 1995; Wang et al., 2001) encontramos que His 169 asociada a este efecto se localiza puntualmente cerca del asa E, que conecta a las láminas  $\beta$  5 y 6 y donde se han localizado residuos (Arg 179, Gly 184) que ayudan en la estabilización de GABA formando puentes de Hidrógeno y enlaces de Van der Waals en la interfase en la subunidad secundaria (-) permitiendo así su interacción progresiva posteriormente con el sitio de unión. Si el grupo imidazol de la cadena lateral de His 169 forma un enlace estable con  $Zn^{2+}$  debido a su gran accesibilidad al solvente, la rigidez de éste generaría un efecto estérico impidiendo el acceso de GABA, aunado al desacoplamiento conformacional que este nuevo enlace ejerce en los residuos polares vecinos. Por otra parte, el efecto de potenciación ejercido por cationes trivalentes como los lantánidos ( $La^{3+}$ ,  $Gd^{3+}$  o  $Lu^{3+}$ ) (Calvo et al., 1994; Narahashi, 2000) aún no ha sido completamente esclarecido, se infiere que no ocurre a nivel del poro debido a que éste no es voltaje dependiente, sin embargo los detalles estructurales relacionados con su interacción y modulación requieren aún de estudios más precisos.

Haciendo un análisis puntual de cada uno de los dominios que constituyen al receptor GABA $\rho$ 1, en relación con los estudios funcionales y ajustando éstos al modelo aquí generado encontramos algunas características interesantes para resaltar. Es necesario también contrastar estos datos con los datos obtenidos a partir de otros modelos del receptor por grupos distintos (Sedelnikova et al., 2005; Harrison y Lummiss, 2006; Abdel-Halim et al., 2008; Adamian et al., 2009; Osolodkin et al., 2009). Muchos de estos modelos son valiosos en relación a los datos aportados puntualmente por el gran dominio N-terminal (que incluye el sitio de unión al ligando, el “Cys-loop”, y varias de las asas que interactúan para desencadenar los cambios conformacionales que llevan a la apertura del poro), debido a que fueron realizados a partir de las estructuras cristalizadas de las distintas isoformas homólogas de la proteína de unión a Acetilcolina, generadas a muy alta resolución. No obstante, un panorama más completo del receptor que pueda

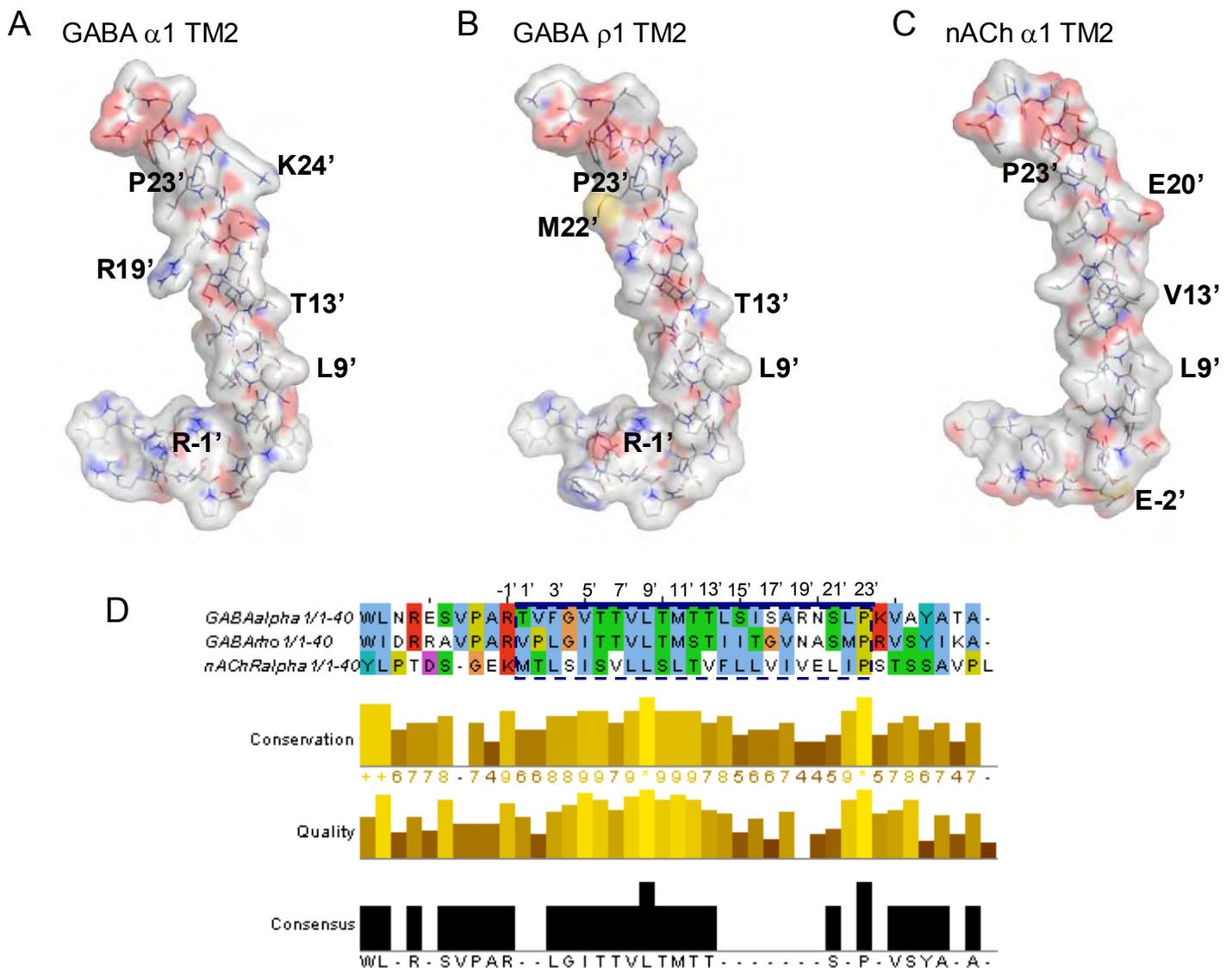
integrar a su vez muchos de los mecanismos que ocurren en cada uno de sus dominios es aún motivo de especulación. Uno de los primeros modelos generados propone que las asas A y E, pero no F son importantes en la formación del sitio de unión al ligando (Sedelnikova et al., 2005); nuestros resultados señalan que los residuos Trp 154, Pro 156, Asp 157, Phe 159, y Val 161 en el asa A de la subunidad principal (+), y Arg 179, Gly 184, Leu 187, y Ser 189 en el asa E de la subunidad accesoria (-), si bien no constituyen estrictamente al sitio de unión, sí se encuentran en la vía accesible de GABA y contribuyen potencialmente para su estabilización, y no así el asa F, que se encuentra poco accesible y distal a dicho sitio. Un estudio más reciente puntualiza al sitio de unión mayormente influenciado por los residuos Tyr 219 en el asa B, y Tyr 268 en el asa C de la subunidad principal (+), y el residuo Arg 125 en la subunidad accesoria (-) (Harrison y Lummis, 2006), lo que coincide con nuestros propios datos, a los que se ha incorporado también Tyr 262 en la subunidad principal (+), y Ser 189 en la subunidad accesoria (Abdel-Halim et al., 2008), y en conjunto con Tyr 221 en el asa B de la subunidad principal (+) se conforma la caja aromática que se ha postulado indispensable para la activación del receptor (Osolodkin et al., 2009). Por último, un modelo recientemente reportado señala la importancia que tienen los residuos Asp 225 en la subunidad principal (+) y Arg 179 en la subunidad accesoria (-) estabilizando el plegamiento del receptor para su correcta expresión en la superficie de la membrana, así como la formación de un puente salino entre ambos residuos que favorece el estado conductor del canal debido a la unión del ligando (Adamian et al., 2009); ambos residuos se encuentran en posiciones consistentes en nuestro modelo, capaces de formar dicha interacción. Tomando todo lo anterior encontramos una gran concordancia estructural respecto a los datos conocidos tanto del sitio de unión al ligando como de los distintos dominios asociados para la estabilización y acoplamiento conformacional que permiten la permeabilidad iónica del canal.

Seccionando uno a uno los distintos dominios para contrastarlos con los datos funcionales a la fecha conocidos encontramos que en el asa C existen cuatro residuos aromáticos (Phe 261, Tyr 262, Trp 267, Tyr 268), de los cuales sólo las tirosinas interactúan de manera importante con el ligando (Lummis, 2009; Melis et al., 2008). Se sabe que en el proceso de activación ocurre la ruptura de un puente salino formado entre las láminas  $\beta$ -7 y  $\beta$ -10 (Mukhtasimova et al., 2005); puntualmente se puede localizar dicho puente en el modelo entre los residuos Ser 213 y Asn 274. La perturbación ocurre debido a la distorsión estructural acarreada indirectamente por el repliegue que tiene el asa C y vinculando un deslizamiento paralelo con la lámina  $\beta$ -10 asociada, debido a la afinidad que gana esta asa (particularmente las tirosinas) por el extremo amino de GABA y que en conjunto con el asa B retienen a dicha molécula con gran afinidad en el sitio de unión. También existe evidencia de que el asa C puede conectarse con el “Cys-loop” transduciendo directamente algunos de los cambios conformacionales a través de un carbohidrato que se conecta en residuos específicos que son glicosilados (Dellisanti et al., 2007). En el modelo los residuos Thr 211 localizado en el “Cys-loop”, y Leu 259 en el asa C cumplen con los requisitos de dicha adaptación y se encuentran orientados de tal manera que permiten esta posibilidad. El “Cys-loop”, por otra parte es un dominio crítico en la interfase; su papel es fundamental pues acopla los eventos que ocurren en el dominio extracelular con el poro a través de la formación de un puente salino transitorio (entre Asp 208 en este dominio y Lys 342 en el asa TM2-TM3), pero que a su vez es consecuencia de la formación y ruptura de otros pares iónicos que ocurren previamente en la secuencia lógica de eventos desencadenados por la unión del ligando (Campos-Caro et al., 1996; Xiu et al., 2005). En el modelo la disposición y orientación que presentan ambos residuos sugiere fuertemente su participación en la formación de dicho

punte; sin embargo debido a que éste fue realizado respecto a la estructura del receptor nicotínico en un estado no conductor el poro se mantiene parcialmente ocluido, y bajo estas condiciones las distancias entre éstos no asegura la formación del puente. No obstante sí puede validar los pares iónicos formados en el estado cerrado, los cuales son los eventos inmediatos anteriores a la formación del puente transitorio que estabiliza el estado conductor en el canal. Tal es el caso de Lys 342 (localizada en el asa TM2-TM3) y Glu 113 (localizado en el asa  $\beta$ -1- $\beta$ -2), un puente salino que debe romperse mediante la activación del receptor (Law y Lightstone, 2009). Ante este evento Glu 113 puede ser estabilizado formando un nuevo puente interactuando con Arg 279 en la sección previa inmediata a la  $\alpha$ -hélice transmembranal 1 (Pre-TM1), dejando así libre a Lys 342 que es atraída por la carga de Asp 208 localizado en el “Cys-loop”, desplazando parcialmente a este dominio y desacoplándolo de su conformación retenida por interacciones hidrofóbicas con residuos específicos en el extremo carboxilo del dominio TM4; esta interacción desplazaría al menos 12° al conjunto de hélices conectadas por el asa intermembranal, es decir las  $\alpha$ -hélices TM2 y TM3, y por tanto al dominio de poro.

Es precisamente el dominio de poro uno de los elementos más estudiados en toda esta familia de receptores. Específicamente en el receptor GABA $\rho$ 1 se han generado una serie de mutantes que han ayudado a determinar aspectos finos relacionados con la permeabilidad iónica. Por ejemplo la posición 2' (**Fig. 28**) ocupada por Pro 315 cerca del límite intracelular del poro es la causa de la menor conductancia (0.2 pS) característica en comparación con la del receptor GABA $\rho$ 2 (3.5 pS) cuya posición es ocupada por una serina, un residuo polar y con menor efecto estérico (Zhu et al., 2007). Al contrastar esta posición en el modelo encontramos que dada su conformación en el estado abierto, este residuo quedaría posicionado justamente en la vía permeable de los iones lo cual asevera fuertemente dicho resultado.

Esta posición se ha vinculado también con la sensibilidad a Picrotoxina; la mutación antes mencionada incrementa la potencia de bloqueo de esta molécula, mientras que una mutación en la posición 6' en el poro (**Fig. 28**) (Thr 319) cambiando a este residuo por una metionina reduce su potencia (Carland et al., 2008). Si bien estas posiciones no están exactamente alineadas en el modelo en un estado no conductor, sí pueden encontrarse accesibles debido a su activación. Se sugiere que el papel de la treonina consiste en aportar electrones libres para la formación de puentes de hidrógeno a través del poro que permiten el acceso de la picrotoxina hasta su interacción final con Pro 315, y su consiguiente efecto de bloqueo. Un cambio más dramático consistió en sustituir por completo a esta  $\alpha$ -hélice por la correspondiente del receptor GABA  $\alpha$ 1 (Martínez-Torres et al., 2000). La magnitud de la corriente fue alrededor de cien veces menor; sin embargo, contrario a lo esperado, la cinética tanto de apertura como de cierre así como su desensibilización no cambiaron significativamente. El intercambio de dominios logra reestructurar parcialmente la naturaleza geométrica del dominio de poro. Los cambios puntuales ocurren de la siguiente manera, Val 314/Thr, Pro 315/Val, Leu 316/Phe, Ile 318/Val, Ser 325/Thr, Ile 327/Leu, Ile 328/Ser, Thr 329/Iso, Gly 330/Ser, Val 331/Ala, Asn 332/Arg. Siendo los cambios más significativos Val 314/Thr, Ile 328/Ser, Thr 329/Iso, Asn 332/Arg (**Fig. 28**), de los cuales los primeros tres cambios modifican la naturaleza química del residuo de polar a hidrofóbico y viceversa, mientras que el último altera a un residuo eléctricamente neutro, cambiándolo por uno cuya carga tiene polaridad positiva.



**Fig 28.** Esquema de la geometría guardada por tres dominios de poro de distintos canales pentaméricos activados por ligando. A, la subunidad  $\alpha$ 1 del receptor GABA $_A$  heteromérico humano. B, la subunidad  $\rho$ 1 del receptor GABA $_A$  humano. C, subunidad  $\alpha$ 1 del receptor nACh de *Torpedo marmorata*. Unwin, 2005. D, Alineamiento de los dominios TM2 anteriores identificando su posición relativa de acuerdo al sistema de numeración universal del dominio de poro en esta familia de proteínas.

En su conjunto estas modificaciones pueden en alguna medida desacoplar las interacciones específicas asociadas con el dominio original, de tal manera que el movimiento del dominio de poro ante la activación del receptor podría verse seriamente comprometido, sin embargo la geometría estructural esencialmente similar entre dominios conserva la cinética intacta. Los detalles relacionados con la disposición helicoidal de los residuos que forman el poro en la subunidad GABA  $\alpha$ 1 ya han sido descritas (Xu y Akabas, 1996), utilizando para ello una técnica que consiste en sustituir cada uno de los residuos que conforma a este dominio por una cisteína a la vez, y debido a que éstas contienen un grupo tiol en su cadena lateral son capaces de reaccionar con metil-metano-tiosulfonatos generando enlaces covalentes (substituted-cysteine accessibility method, SCAM). Los residuos expuestos a lo largo del poro en estado conductor fueron, Val 2' (315), Thr 6' (319), Thr 7' (320), Leu 9' (322), Thr 10' (323), Thr 13' (326), Arg 19' (332) (Xu y Akabas, 1996; Pascual y Karlin, 1998; Wilson y Karlin, 2001; Bera et al., 2002). En su mayoría coinciden con los residuos equivalentes en el receptor GABA $\rho$ 1, con excepción de la posición 315 (Pro 2') y 332 (Asn 19'), encontradas en ambos extremos del poro. No obstante, los residuos encontrados en las posiciones 314 (Val 1'), 328 (Ile 15'), y 329 (Thr 16'), orientados a regiones más hidrofóbicas de la proteína requieren un pequeño repliegue (un giro aproximado de 2-3° en sentido dextrahelicoidal) en la  $\alpha$ -hélice para lograr una conformación termodinámicamente estable. Esta distorsión puede impedir las interacciones con los dominios acoplados en el desplazamiento del poro para llegar al estado permeable, lo cual justifica la disminución en la corriente.

En contraste con todo lo anterior, el dominio de poro del receptor nicotínico así como el serotoninérgico aunque conservan una geometría similar revelan en la porción superior de la membrana un vestíbulo predominantemente hidrofóbico que lo hace menos accesible para la formación de puentes de hidrógeno como ocurre en los receptores que forman poros de selectividad aniónica (Panicker et al., 2002). Por otra parte se ha calculado que el poro en el estado conductor de los canales aniónicos se encuentra en el rango de 0.5-0.6 nm, siendo este último límite (0.61 nm) el diámetro estimado para el receptor homomérico GABA $\rho$ 1 (Wotring et al., 1999), en contraste se ha deducido que el diámetro del receptor nicotínico es de 0.74 nm (Wang e Imoto, 1992), estos valores son difíciles de contrastar pues el modelo se limita a identificar las características definidas por el estado no conductor.

En el estado anteriormente descrito, el poro conserva una leucina en la parte media de la hélice; dicho residuo altamente hidrofóbico se encuentra conservado en todos los distintos miembros de la familia de receptores pentaméricos, por lo que ha sido asociado con el control de la permeabilidad iónica y comúnmente se le ha llamado dominio de compuerta. En el receptor nicotínico se realizaron distintos estudios cuyo objetivo fue generar mutaciones puntuales sustituyendo a dicho residuo por otros, cuya naturaleza química desencadenó la generación de respuestas alteradas significativamente, desde cambios en la magnitud de la corriente, así como en la cinética de activación e inactivación, hasta la capacidad de interacción o modulación por moléculas que en condiciones silvestres no lo hacían (Revah et al., 1991; Bertrand et al., 1992; Filatov y White, 1995; Weiland et al., 1996). Aproximaciones similares han sido realizadas en el receptor de 5HT- $3A$  (Yakel et al., 1993), y GABA $A$  heteromérico (Chang et al., 1996). En el caso del receptor homomérico GABA $\rho$ 1 se han realizado también mutaciones puntuales con resultados distintos, desde la generación de canales constitutivamente abiertos al sustituir por residuos polares como alanina (Pan et al., 1997), glicina, serina y treonina, o bien cambios en las propiedades de sensibilización e inactivación sustituyendo por tirosina, fenilalanina, e isoleucina (Chang y Weiss, 1998),

e incluso puede incrementar el efecto de modulación por Taurina al sustituir a la leucina anteriormente descrita por el residuo aspartato (Martínez-Torres y Miledi, 2004). En su conjunto los datos sugieren que este residuo es crítico para la permeabilidad iónica; la estructura del receptor nicotínico puede establecer esta posición como el punto de oclusión máxima en el estado no conductor con un diámetro no mayor a 0.6 nm que llega hasta poco menos de 0.8 nm en Val 13', un límite que un ión  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$  con su primer capa de hidratación no podría superar (Corry, 2006; Haddadian et al., 2008). La posición así como la orientación de este residuo se conserva consistentemente en el modelo de  $\text{GABA}_\rho 1$ , con la excepción de que la hélice se inclina ligeramente produciendo una oclusión menor a 0.5 nm, y en este caso impidiendo el paso a  $\text{Cl}^-$  con su primer capa de hidratación. Una discrepancia más con el receptor nicotínico es el papel que jugarían algunos residuos hidrofóbicos (Val 321, Met 324) que precisamente debido a la inclinación de la hélice y a su disposición de accesibilidad en el estado no conductor parecen crear una barrera energética más pronunciada, que es capaz de separar el poro en dos vestíbulos físicos llenos de agua.

Respecto a los residuos en el poro, que por su polaridad eléctrica han sido relacionados con la selectividad iónica, podemos resaltar algunas características interesantes. En una primera aproximación se cambió el dominio de poro completo del receptor nicotínico  $\alpha 7$  por el dominio equivalente del receptor de Glicina  $\alpha 1$  (Galzi et al., 1992); sin embargo el resultado de esta quimera no produjo receptores funcionales, y este fracaso fue explicado por la perturbación de la estructura terciaria y cuaternaria de este dominio impactando así a la estructura global del receptor; con base en estos resultados se realizó una segunda aproximación en la cual se identificó que la posición -1' del dominio de poro en los canales catiónicos ocupada por un residuo glutámico es importante para su selectividad; se realizó una estrategia que modificó de manera más fina la arquitectura de este dominio en el receptor nicotínico homomérico  $\alpha 7$  tanto a nivel geométrico como eléctrico, introduciendo una prolina entre las posiciones Gly, -2', y Glu, -1' (un residuo que en los canales aniónicos no tiene equivalente) (**Fig. 28**), de tal manera que esta prolina ocupa la nueva posición -1''; a su vez Glu, -1' fue sustituido por alanina, y Lys 0' (cuya posición correspondiente en los canales aniónicos es -1') toma el papel de arginina que por sus características de polaridad eléctrica similares a las de los receptores GABA y Glicina puede admitir esa disposición; por último, la posición 13' fue modificada de Valina en el receptor silvestre por Treonina, emulando finalmente al poro característico de los canales aniónicos (**Fig. 28**) (Galzi et al., 1992; Corringer et al., 1999). Los resultados mostraron un cambio dramático en la selectividad iónica del canal ante el mismo ligando; esta inversión en la selectividad ha sido replicada en diferentes casos con otros receptores, utilizando la misma estrategia en el receptor 5-HT<sub>3A</sub> (Gunthorpe et al., 2000); o bien la estrategia inversa, eliminando a la prolina (-3' en los canales aniónicos), y cambiando Ala, -2' por un residuo glutámico, y Thr por Val en la posición 13' en el receptor de Glicina  $\alpha 1$  (**Fig. 28**) (Keramidas et al., 2000),  $\text{GABA}_\rho 1$  (Wotring et al., 2003), y  $\text{GABA}_A(\alpha 2\beta 3\gamma 2)$  (Jensen et al., 2005), también mostrando una consistente inversión en la selectividad iónica.

Todos estos datos en su conjunto demuestran que es necesaria tanto la naturaleza geométrica de los residuos críticos antes mencionados, como la interacción dipolo-dipolo entre un residuo con una polaridad eléctrica particular, así como el ión específico en interacción durante el proceso de conducción, ya que la mayor parte del dominio de poro en este estado en ambos tipos distintos de receptores presenta características topológicas similares. Por otra parte, es difícil contrastar la posición de este residuo en el modelo, pues sólo se conocen los detalles estructurales del receptor nicotínico en el estado no conductor. En este estado la posición de Glu, -1' es tal que su cadena lateral

se encuentra parcialmente obstruida en el extremo inferior de la hélice, cerca del citoplasma. La posición que adopta el residuo Arg, -1' equivalente del modelo de GABA<sub>A</sub>1 tiene una disposición similar (**Fig. 26**); el grado de accesibilidad de este residuo al solvente, en función del desplazamiento de todo el dominio al que pertenece debe cambiar su orientación y así también modificar las propiedades biofísicas del canal en un momento determinado.

La  $\alpha$ -hélice TM4, siendo el dominio más distal al centro del poro, además de formar un revestimiento que incorpora al canal iónico en la membrana tiene otras propiedades interesantes; la interfase entre este dominio y las hélices TM1 y TM3 se encuentra conectada por residuos altamente hidrofóbicos que conforman un centro muy compacto. Recientemente se demostró la interacción que juega TM4 con las  $\alpha$ -hélices TM1 y TM3 en el receptor de Glicina al cambiar uno a uno los residuos que conforman a estas hélices por alaninas (Haeger et al., 2010), determinando así que eran críticos algunos de ellos en las posiciones de TM1: Tyr 228, Val 235, Trp 239, Phe 242, Trp 243; de TM3: Trp 286, Phe 293; y de TM4: Phe 395, Pro 396, Tyr 406, Trp 407. La mayor parte de estos residuos son aromáticos, ayudan a estabilizar los dominios transmembranales para su adecuada función en la membrana a través de interacciones hidrofóbicas. Muchas de estas interacciones son estructuradas por el apilamiento de grupos aromáticos conocida como  $\pi$ - $\pi$  (Dougherty, 2007). Todos estos residuos se encuentran altamente conservados al ser contrastados con los alineamientos realizados para los receptores que forman canales aniónicos.

En nuestro modelo encontramos interacciones hidrofóbicas entre Phe 282, Leu 285, Tyr 289, Ala 292, Met 295, Val 296, Trp 300, Trp 304, en TM1; Tyr 347, Val 350, Val 353, Leu 360, Ala 364, Leu 368, en TM3; e Ile 450, Ala 454, Lys 457, Ile461, Pro 464, Ala 465, Ile 468, y Leu 472, en TM4, consistentemente los mismos residuos críticos se conservan en una disposición similar. Además se probó la integridad funcional de este dominio utilizando una estrategia distinta a través de la expresión de quimeras en ovocitos que independientemente eliminaban al dominio TM4 y un fragmento del asa intracelular que conecta TM3-TM4 (del extremo N-terminal al residuo 325) (Haeger et al., 2010). Estas quimeras no fueron funcionales de manera independiente, a pesar de que tenían la capacidad de llegar a la membrana. Por otra parte se expresó el dominio TM4 acoplado a un fragmento del asa TM3-TM4 también de manera independiente, conteniendo a su vez parte del asa intracelular (del residuo 376 al C-terminal); esta construcción generó fundamentalmente agregados en la célula que tampoco fueron funcionales. Sin embargo, al coexpresar ambas construcciones quiméricas se logró rescatar la función del receptor, aún cuando ambos dominios no estaban conectados por una misma cadena polipeptídica. La interpretación de estos datos propone que el empaquetamiento entre las hélices que componen a los dominios transmembranales en una subunidad, y entre subunidades en el pentámero, ocurre a través de una vasta red de interacciones hidrofóbicas acopladas entre sí por su posición espacial a nivel de la membrana. Esta conjetura había sido realizada previamente utilizando sondas hidrofóbicas para identificar la naturaleza de los residuos que se encontraban expuestos a los fosfolípidos en la membrana (Adamian et al., 2005), identificando esencialmente residuos como isoleucina, leucina, fenilalanina, y valina en las regiones mediales de las hélices, mientras que residuos como lisina, arginina, y triptofano se encuentran expuestas comúnmente en las interfases, en los límites polares de ésta. Se han realizado también algunos estudios que tratan de identificar los sitios de modulación de fármacos como alcoholoes o anestésicos volátiles en los receptores GABA<sub>A</sub> heteroméricos en general, y que difieren estructuralmente de GABA<sub>A</sub>1 homoméricos, los cuales no son modulados significativamente por estas moléculas. Algunas de las principales

diferencias entre ambos receptores han sido identificadas en residuos relacionados al dominio de poro (TM2) pero cuya localización tiene una orientación contraria al canal iónico, es decir hacia la interfase polar formada entre las hélices TM1 (Leu 232), TM2 (Ser 270), y TM3 (Ala 291), y que en el receptor GABA $\rho$ 1 corresponden a residuos hidrofóbicos con un importante efecto estérico (Mihic et al., 1997). No obstante, se identificó que la interfase entre los dominios TM1, TM3 y TM4 es también importante para la actividad de estos moduladores como lo demostró un estudio de mutagénesis en el que se modificó la posición de cada uno de los residuos que conforman al dominio TM4 (GABA $\rho$ ) sustituyendo cada residuo por un triptofano a la vez, produciendo así una modulación positiva o negativa de acuerdo a la posición ocupada (Jenkins et al., 2002). Otra característica importante del dominio TM4 es su extremo C-terminal, que aunque en los diferentes miembros de la familia de receptores pentaméricos presenta una moderada divergencia en la secuencia, en todos los casos invariablemente conserva al menos dos o tres residuos aromáticos más allá del límite superior de la membrana, hacia la interfase que conecta con el gran dominio N-terminal extracelular, lo que lo hace estructuralmente similar.

Un interesante estudio propone que su papel funcional es imprescindible para el receptor (Pons et al., 2004); éste fue realizado en una quimera del receptor nicotínico homomérico  $\alpha$ -7, el cual es bloqueado selectivamente por la  $\alpha$ -bungarotoxina. Sucesivamente se fueron eliminando uno a uno los residuos que componen el extremo C-terminal en el dominio TM4 encontrando que, aunque con capacidad de llegar a la membrana, conforme más residuos perdía el receptor había cada vez menos moléculas de la toxina unida, de tal manera que uno de los últimos residuos (Trp 443) cuya posición se localiza en la interfase y tiene naturaleza aromática resultó ser fundamental para la conformación funcional del receptor durante el reconocimiento de la toxina. En base a esto se propuso que el extremo C-terminal, a través de la interacción con este residuo, así como Tyr 448 interactúan con el dominio N-terminal a nivel del “Cys-loop”, atrapándolo en un estado conformacionalmente disponible para la unión de moduladores. Un estudio similar utilizando un radioligando fue realizado en el receptor 5-HT $_3A$  y sus resultados fueron similares (Butler et al., 2009); en este caso dicha posición correspondió con el residuo hidrofóbico Ala 455, lo cual no ocurrió con Gln 453 y Tyr 454 y al realizar mutaciones puntuales en este residuo sustituyendo por glicina, valina, o isoleucina, recuperó su función en un 24%, 32%, y 88% respectivamente, evidenciado así la importancia de la hidrofobicidad para su interacción y correcta función en la membrana. Estos resultados fueron bastante contundentes, más sin embargo a la fecha no se había registrado el impacto en la función de este dominio a nivel electrofisiológico.

Las deleciones sistemáticas del C-terminal en el dominio TM4 del receptor GABA $\rho$ 1 (Reyes-Ruiz et al., 2010) han servido como un elemento preliminar fundamental detrás de los modelos *in silico* aquí presentados (**Fig. 24**), pues son las primeras pruebas electrofisiológicas que respaldan la arquitectura tridimensional de este dominio. Nuestros mutantes puntuales impactan al modelo a distintos niveles, por ejemplo la arquitectura se preserva en las sustituciones por los residuos alanina, fenilalanina y leucina que por su naturaleza hidrofóbica permiten una interacción similar a la del triptofano en el receptor silvestre; sin embargo, aspartato y glicina no distorsionan significativamente esta arquitectura, en el primer caso por la posible formación de un puente salino entre las posiciones Pro 206 y Leu 207, siendo el enlace polipeptídico que conecta a ambos residuos en el “Cys-loop” con Asp 475 la fuente de electrones potencial; mientras que en la sustitución por glicina sólo la geometría de TM4 y la ausencia de residuos polares críticos puede mantener parcialmente la estabilidad. Por

otra parte la mutación que elimina a esta posición (Trp 475 $\Delta$ ) así como la sustitución por arginina, distorsionan la arquitectura de la hélice e impiden una correcta interacción hidrofóbica que podría comprometer la estabilidad de la estructura y así también su función. Un caso interesante son las deleciones puntuales de los residuos que flanquean la posición de Trp 475, es decir Tyr 474 $\Delta$ , y Ser 476 $\Delta$ , donde la primera altera la posición del triptofano a una orientación distinta en la membrana, perturbando así su interacción con el “Cys-loop”, y exponiendo en su lugar a un residuo polar (Serina), que es incapaz de estabilizar el dominio y la arquitectura se asemeja a la de Trp 475 $\Delta$ , sugiriendo que impacta también significativamente la función del receptor. La segunda deleción modifica las posiciones de los últimos residuos en la hélice, pero aún así se preserva una arquitectura similar a la del receptor silvestre debido a que Trp 475 mantiene su posición e interacción hidrofóbica permitiendo que Ile 477 y Phe 478 se reestructuren formando una triada similar a la triada original (**Fig. 24**).

El último dominio por ser analizado es el asa intracelular TM3-TM4, seguido del dominio accesorio a la membrana (MA). La información estructural es aún escasa y en gran medida los resultados conocidos son controversiales. No es posible contrastar por ejemplo los datos estructurales del modelo con las proteínas que se encuentran asociadas tanto en la membrana como en el citoplasma debido a la baja resolución, y a que una parte importante del mismo todavía se desconoce a detalle. Algunos experimentos realizados por distintos grupos señalan que, aunque moderadamente, los residuos cargados en este dominio pueden impactar si bien no la selectividad iónica (Jansen et al., 2008), sí la magnitud de las corrientes (Carland et al., 2009), invirtiendo la polaridad de carga de los ocho residuos básicos localizados en el dominio mencionado del receptor de Glicina  $\alpha 1$  por residuos con carga contraria (residuos glutámicos cargados negativamente), y fue determinada en el caso más dramático la pérdida de la función, lo que ocurrió al incluir todas las mutaciones acumuladas en un mismo receptor, o bien una importante disminución en la conductancia al incluir sólo cuatro de estos cambios. La reducción consistió en una modificación que partió de los  $92.2 \pm 2.8$  pS en el receptor silvestre, hasta  $60.0 \pm 2.2$  pS en el mutante que contenía a los residuos glutámicos en las posiciones 377, 378, 385 y 386. Cuando estas mismas posiciones fueron sólo neutralizadas en la polaridad de su carga sustituyéndolas por alaninas se encontró una reducción más modesta en la conductancia, llegando a  $80.5 \pm 2.3$  pS, lo cual sugiere que este dominio realmente auxilia favoreciendo al filtro de selectividad estricto, generando así un vestíbulo de preselección iónica. En contraste, al determinar la posición de estos residuos en la secuencia, y posteriormente en la estructura del modelo de GABA $\rho 1$  no encontramos una buena correlación, de hecho este dominio es el menos conservado entre los miembros de la familia lo cual sugiere, por otra parte, que su arquitectura específica a este nivel les confiere propiedades distintas por la capacidad para interactuar también con diferentes proteínas en la membrana dado el caso. Los residuos cuya carga eléctrica y disposición en el modelo pueden tener interacción con la permeabilidad iónica son Lys 419, Arg 422, Arg 433, y Arg 438, que aunque son sugerentes, su función real aún deberá ser validada experimentalmente.

## Conclusiones

El desarrollo y optimización de un modelo por homología del receptor GABA $\rho$ 1 nos ha permitido identificar al menos una unidad funcional, la cual se desconocía su existencia hasta hace muy poco.

A falta de una estructura completa de alta resolución que explique muchos de los elementos estructurales detrás de las funciones de este receptor, los modelos por homología bien contrastados y validados por la información biológica y experimentos, pueden ser de gran utilidad para los estudios de estructura-función de este tipo de proteínas.

## Referencias

1. Abdel-Halim H, Hanrahan JR, Hibbs DE, Johnston GA, Chebib M. 2008. A molecular basis for agonist and antagonist actions at GABA(C) receptors. *Chem Biol Drug Des* **71**, 306-27.
2. Absalom NL, Lewis TM, Kaplan W, Pierce KD, Schofield PR. 2003. Role of charged residues in coupling ligand binding and channel activation in the extracellular domain of the glycine receptor. *J Biol Chem* **278**, 50151-7.
3. Adamian L, Gussin HA, Tseng YY, Muni NJ, Feng F, Qian H, Pepperberg DR, Liang J. 2009. Structural model of rho1 GABAC receptor based on evolutionary analysis: Testing of predicted protein-protein interactions involved in receptor assembly and function. *Protein Sci* **18**, 2371-83.
4. Adamian L, Nanda V, DeGrado WF, Liang J. 2005. Empirical lipid propensities of amino acid residues in multispans alpha helical membrane proteins. *Proteins* **59**, 496-509.
5. Adcock C, Smith GR, Sansom MS. 1998. Electrostatics and the ion selectivity of ligand-gated channels. *Biophys J* **75**, 1211-22.
6. Adcock C, Smith GR, Sansom MS. 1998. Electrostatics of ligand-gated ion channels. *Biochem Soc Trans* **26**, S300.
7. Aguilera-Arzo M, Andrio A, Aguilera VM, Alcaraz A. 2009. Dielectric saturation of water in a membrane protein channel. *Phys Chem Chem Phys* **11**, 358-65.
8. Alakuijala A, Alakuijala J, Pasternack M. 2006. Evidence for a functional role of GABA receptors in the rat mature hippocampus. *Eur J Neurosci* **23**, 514-20.
9. Albuquerque EX, Oliveira AC. 1979. Physiological studies on the ionic channel of nicotinic neuromuscular synapses. *Adv Cytopharmacol* **3**, 197-211.

10. Amin J, Weiss DS. 1994. Homomeric rho 1 GABA channels: activation properties and domains. *Receptors Channels* **2**, 227-36.
11. Amiri S, Tai K, Beckstein O, Biggin PC, Sansom MS. 2005. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor: molecular modelling, electrostatics, and energetics. *Mol Membr Biol* **22**, 151-62.
12. Auerbach A. 2009. The Gating Isomerization of Acetylcholine Receptors. *J Physiol*, en prensa.
13. Babakhani A, Talley TT, Taylor P, McCammon JA. 2009. A virtual screening study of the acetylcholine binding protein using a relaxed-complex approach. *Comput Biol Chem* **33**, 160-70.
14. Barnard EA, Bilbe G, Houamed K, Moss SJ, Van Renterghem C, Smart TG. 1987. Functional expression in the *Xenopus* oocyte of messenger ribonucleic acids encoding brain neurotransmitter receptors: further characterisation of the implanted GABA receptor. *Neuropharmacology* **26**, 837-44.
15. Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ. 1998. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* **50**, 291-313.
16. Barnes NM, Hales TG, Lummis SC, Peters JA. 1999. The 5-HT3 receptor--the relationship between structure and function. *Neuropharmacology* **56**, 273-84.
17. Bartos M, Corradi J, Bouzat C. 2009. Structural Basis of Activation of Cys-Loop Receptors: the Extracellular-Transmembrane Interface as a Coupling Region. *Mol Neurobiol*, en prensa.
18. Bates, P.A., Kelley, L.A., MacCallum, R.M. and Sternberg, M.J.E. 2001. Enhancement of Protein Modelling by Human Intervention in Applying the Automatic Programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM. *Proteins* **5**, 39-46.
19. Beckstein O, Sansom MS. 2006. A hydrophobic gate in an ion channel: the closed state of the nicotinic acetylcholine receptor. *Phys Biol* **3**, 147-59.
20. Bellelli D, Pau D, Cabras G, Peters JA, Lambert JJ. 1999. A single amino acid confers barbiturate sensitivity upon the GABA rho 1 receptor. *Br J Pharmacol* **127**, 601-4.
21. Benfenati V, Ferroni S. Water transport between CNS compartments: functional and molecular interactions between aquaporins and ion channels. *Neuroscience*, en prensa.
22. Bera AK, Chatav M, Akabas MH. 2002. GABA(A) receptor M2-M3 loop secondary structure and changes in accessibility during channel gating. *J Biol Chem* **277**, 43002-10.
23. Bertrand D, Devillers-Thiéry A, Revah F, Galzi JL, Hussy N, Mulle C, Bertrand S, Ballivet M, Changeux JP. 1992. Unconventional pharmacology of a neuronal nicotinic receptor mutated in the channel domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1261-5.
24. Bezanilla F. 2008. Ion channels: from conductance to structure. *Neuron* **60**, 456-68.
25. Billups D, Hanley JG, Orme M, Attwell D, Moss SJ. 2000. GABAC receptor sensitivity is modulated by interaction with MAP1B. *J Neurosci* **20**, 8643-50.
26. Bisson WH, Westera G, Schubiger PA, Scapozza L. 2008. Homology modeling and dynamics of the extracellular domain of rat and human neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes alpha4beta2 and alpha7. *J Mol Model* **14**, 891-9.
27. Bocquet N, Nury H, Baaden M, Le Poupon C, Changeux JP, Delarue M, Corringer PJ. 2009. *Nature* **457**, 111-4.

28. Boller M, Schmidt M. 2001. Postnatal maturation of GABA(A) and GABA(C) receptor function in the mammalian superior colliculus. *Eur J Neurosci* **14**, 1185-93.
29. Bormann J, Hamill OP, Sakmann B. 1987. Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J Physiol* **385**, 243-86.
30. Born G, Schmidt M. 2007. GABAergic pathways in the rat subcortical visual system: a comparative study in vivo and in vitro. *Eur J Neurosci* **26**, 1183-92.
31. Boue-Grabot E, Roudbaraki M, Bascles L, Tramu G, Bloch B, Garret M. 1998. Expression of GABA receptor rho subunits in rat brain. *J Neurochem* **70**, 899-907.
32. Bouzat C, Bartos M, Corradi J, Sine SM. 2008. The interface between extracellular and transmembrane domains of homomeric Cys-loop receptors governs open-channel lifetime and rate of desensitization. *J Neurosci* **28**, 7808-19.
33. Bouzat C, Gumilar F, Spitzmaul G, Wang HL, Rayes D, Hansen SB, Taylor P, Sine SM. 2004. Coupling of agonist binding to channel gating in an ACh-binding protein linked to an ion channel. *Nature* **430**, 896-900.
34. Brejc K, van Dijk WJ, Klaassen RV, Schuurmans M, van Der Oost J, Smit AB, Sixma TK. 2001. *Nature* **411**, 269-76.
35. Burada PS, Hänggi P, Marchesoni F, Schmid G, Talkner P. 2009. Diffusion in confined geometries. *Chemphyschem* **10**, 45-54.
36. Butler AS, Lindsay SA, Dover TJ, Kennedy MD, Patchell VB, Levine BA, Hope AG, Barnes NM. 2009. Importance of the C-terminus of the human 5-HT3A receptor subunit. *Neuropharmacology* **56**, 292-302.
37. Calvo DJ, Vazquez AE, Miledi R. 1994. Cationic modulation of rho 1-type gamma-aminobutyrate receptors expressed in Xenopus oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12725-9.
38. Campagna-Slater V, Weaver DF. 2007. Molecular modelling of the GABAA ion channel protein. *J Mol Graph Model* **25**, 721-30.
39. Campos-Caro A, Sala S, Ballesta JJ, Vicente-Agulló F, Criado M, Sala F. 1996. A single residue in the M2-M3 loop is a major determinant of coupling between binding and gating in neuronal nicotinic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6118-23.
40. Carland JE, Cooper MA, Sugiharto S, Jeong HJ, Lewis TM, Barry PH, Peters JA, Lambert JJ, Moorhouse AJ. 2009. Characterization of the effects of charged residues in the intracellular loop on ion permeation in alpha1 glycine receptor channels. *J Biol Chem* **284**, 2023-30.
41. Carland JE, Johnston GA, Chebib M. 2008. Relative impact of residues at the intracellular and extracellular ends of the human GABAC rho1 receptor M2 domain on picrotoxinin activity. *Eur J Pharmacol* **580**, 27-35.
42. Carlier PR, Chow ES, Barlow RL, Bloomquist JR. 2002. Discovery of non-zwitterionic GABA(A) receptor full agonists and a superagonist. *Bioorg Med Chem Lett* **12**, 1985-8.
43. Cederholm JM, Schofield PR, Lewis TM. 2009. Gating mechanisms in Cys-loop receptors. *Eur Biophys J* **39**, 37-49.
44. Celie PH, Klaassen RV, van Rossum-Fikkert SE, van Elk R, van Nierop P, Smit AB, Sixma TK. 2005. Crystal structure of acetylcholine-binding protein from *Bulinus truncatus* reveals the conserved structural scaffold and sites of variation in nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* **280**, 26457-66.

45. Chang Y, Wang R, Barot S, Weiss DS. 1996. Stoichiometry of a recombinant GABAA receptor. *J Neurosci* **16**, 5415-24.
46. Chang Y, Weiss DS. 1998. Substitutions of the highly conserved M2 leucine create spontaneously opening rho1 gamma-aminobutyric acid receptors. *Mol Pharmacol* **53**, 511-23.
47. Chang Y, Weiss DS. 1999. Channel opening locks agonist onto the GABAC receptor. *Nat Neurosci* **2**, 219-25.
48. Chang YC, Wu W, Zhang JL, Huang Y. 2009. Allosteric activation mechanism of the cys-loop receptors. *Acta Pharmacol Sin* **30**, 663-72.
49. Changeux JP, Taly A. 2008. Nicotinic receptors, allosteric proteins and medicine. *Trends Mol Med* **14**, 93-102.
50. Chen L, Durkin KA, Casida JE. 2006. Structural model for gamma-aminobutyric acid receptor noncompetitive antagonist binding: widely diverse structures fit the same site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5185-90.
51. Cheng X, Ivanov I, Wang H, Sine SM, McCammon JA. 2009. Molecular-dynamics simulations of ELIC-a prokaryotic homologue of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biophys J* **96**, 4502-13.
52. Chupakhin VI, Palyulin VA, Zefirov NS. 2006. Modeling the open and closed forms of GABAA receptor: analysis of ligand-receptor interactions for the GABA-binding site. *Dokl Biochem Biophys* **408**, 169-74.
53. Ci SQ, Ren TR, Ma CX, Su ZG. 2007. Modeling of alphak/gamma2 (k=1, 2, 3 and 5) interface of GABA A receptor and docking studies with zolpidem: implications for selectivity. *J Mol Graph Model* **26**, 537-45.
54. Clayton T, Chen JL, Ernst M, Richter L, Cromer BA, Morton CJ, Ng H, Kaczorowski CC, Helmstetter FJ, Furtmüller R, Ecker G, Parker MW, Sieghart W, Cook JM. 2007. An updated unified pharmacophore model of the benzodiazepine binding site on gamma-aminobutyric acid(a) receptors: correlation with comparative models. *Curr Med Chem* **14**, 2755-75.
55. Cockcroft VB, Osguthorpe DJ, Barnard EA, Friday AE, Lunt GG. 1990. Ligand-gated ion channels. Homology and diversity. *Mol Neurobiol* **4**, 129-69.
56. Cole C, Barber JD, Barton GJ. 2008. The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res* **36**, 197-201.
57. Combet C, Jambon M, Deléage G, Geourjon C. 2002. Geno3D: Automatic comparative molecular modelling of protein. *Bioinformatics* **18**, 213-14.
58. Cope DW, Di Giovanni G, Fyson SJ, Orbán G, Errington AC, Lorincz ML, Gould TM, Carter DA, Crunelli V. 2009. Enhanced tonic GABAA inhibition in typical absence epilepsy. *Nat Med* **15**, 1392-8.
59. Corringer PJ, Bertrand S, Galzi JL, Devillers-Thiéry A, Changeux JP, Bertrand D. 1999. Mutational analysis of the charge selectivity filter of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* **22**, 831-43.
60. Corringer PJ, Le Novère N, Changeux JP. 2000. Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**, 431-58.
61. Corry B. 2006. An energy-efficient gating mechanism in the acetylcholine receptor channel suggested by molecular and Brownian dynamics. *Biophys J* **90**, 799-810.
62. Croci C, Brändstätter JH, Enz R. 2003. ZIP3, a new splice variant of the PKC-zeta-interacting protein family, binds to GABAC receptors, PKC-zeta, and Kv beta 2. *J Biol Chem* **278**, 6128-35.
63. Cutting GR, Lu L, O'Hara BF, Kasch LM, Montrose-Rafizadeh C, Donovan DM, Shimada S, Antonarakis SE, Guggino WB, Uhl GR, Kazazian H. 1991.

- Cloning of the gamma-aminobutyric acid (GABA) rho 1 DNAc: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2673-7.
64. Cymes GD, Grosman C. 2008. Pore-opening mechanism of the nicotinic acetylcholine receptor evinced by proton transfer. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 389-96.
  65. Cymes GD, Ni Y, Grosman C. 2005. Probing ion-channel pores one proton at a time. *Nature* **438**, 975-80.
  66. Dascal N. 1987. The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit Rev Biochem* **22**, 317-87.
  67. Davies PA, Wang W, Hales TG, Kirkness EF. 2003. A novel class of ligand-gated ion channel is activated by Zn<sup>2+</sup>. *J Biol Chem* **278**, 712-7.
  68. de Planque MR, Boots JW, Rijkers DT, Liskamp RM, Greathouse DV, Killian JA. 2002. The effects of hydrophobic mismatch between phosphatidylcholine bilayers and transmembrane alpha-helical peptides depend on the nature of interfacially exposed aromatic and charged residues. *Biochemistry* **41**, 8396-404.
  69. Dellisanti CD, Yao Y, Stroud JC, Wang ZZ, Chen L. 2007. Crystal structure of the extracellular domain of nAChR alpha1 bound to alpha-bungarotoxin at 1.94 Å resolution. *Nat Neurosci* **10**, 953-62.
  70. DeSimone RW, Currie KS, Mitchell SA, Darrow JW, Pippin DA. 2004. Privileged structures: applications in drug discovery. *Comb Chem High Throughput Screen* **7**, 473-94.
  71. D'hoedt D, Bertrand D. 2009. Nicotinic acetylcholine receptors: an overview on drug discovery. *Expert Opin Ther Targets* **13**, 395-411.
  72. Didelon F, Sciancalepore M, Savic' N, Mladinic' M, Bradbury A, Cherubini E. 2002. gamma-Aminobutyric acidA rho receptor subunits in the developing rat hippocampus. *J Neurosci Res* **67**, 739-44.
  73. Dougherty DA. 2007. Cation-pi interactions involving aromatic amino acids. *J Nutr* **137**, 1504S-1508.
  74. Draheim RR, Bormans AF, Lai RZ, Manson MD. 2005. Tryptophan residues flanking the second transmembrane helix (TM2) set the signaling state of the Tar chemoreceptor. *Biochemistry* **44**, 1268-77.
  75. Enz R, Cutting GR. 1999. GABAC receptor rho subunits are heterogeneously expressed in the human CNS and form homo- and heterooligomers with distinct physical properties. *Eur J Neurosci* **11**, 41-50.
  76. Farrant M, Nusser Z. 2005. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* **6**, 215-29.
  77. Fatima-Shad K, Barry PH. 1993. Anion permeation in GABA- and glycine-gated channels of mammalian cultured hippocampal neurons. *Proc Biol Sci* **253**, 69-75.
  78. Feigenspan A, Bormann J. 1994. Differential pharmacology of GABAA and GABAC receptors on rat retinal bipolar cells. *Eur J Pharmacol* **288**, 97-104.
  79. Feigenspan A, Wässle H, Bormann J. 1993. Pharmacology of GABA receptor Cl<sup>-</sup> channels in rat retinal bipolar cells. *Nature* **361**, 159-62.
  80. Filatov GN, White MM. 1995. The role of conserved leucines in the M2 domain of the acetylcholine receptor in channel gating. *Mol Pharmacol* **48**, 379-84.
  81. Filippova N, Dudley R, Weiss DS. 1999. Evidence for phosphorylation-dependent internalization of recombinant human rho1 GABAC receptors. *J Physiol* **518**, 385-99.

82. Filippova N, Wotring VE, Weiss DS. 2004. Evidence that the TM1-TM2 loop contributes to the rho1 GABA receptor pore. *J Biol Chem* **279**, 20906-14.
83. Fletcher EL, Clark MJ, Senior P, Furness JB. 2001. Gene expression and localization of GABA(C) receptors in neurons of the rat gastrointestinal tract. *Neuroscience* **107**, 181-9.
84. Fonseca V, Daumas P, Ranjalahy-Rasoloarijao L, Heitz F, Lazaro R, Trudelle Y, Andersen OS. 1992. Gramicidin channels that have no tryptophan residues. *Biochemistry* **31**, 5340-50.
85. Forney MW, Janosi L, Kosztin I. 2008. Calculating free-energy profiles in biomolecular systems from fast nonequilibrium processes. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **78**, 051913.
86. Friis S, Mathes C, Sunesen M, Bowlby MR, Dunlop J. 2009. Characterization of compounds on nicotinic acetylcholine receptor alpha7 channels using higher throughput electrophysiology. *J Neurosci Methods* **177**, 142-8.
87. Fritschy JM, Brünig I. 2003. Formation and plasticity of GABAergic synapses: physiological mechanisms and pathophysiological implications. *Pharmacol Ther* **98**, 299-323.
88. Galvez-Ruano E, Aprison MH, Robertson DH, Lipkowitz KB. 1995. Identifying agonistic and antagonistic mechanisms operative at the GABA receptor. *J Neurosci Res* **42**, 666-73.
89. Galzi JL, Devillers-Thiéry A, Hussy N, Bertrand S, Changeux JP, Bertrand D. 1992. Mutations in the channel domain of a neuronal nicotinic receptor convert ion selectivity from cationic to anionic. *Nature* **359**, 500-5.
90. Gamel-Didelon K, Kunz L, Fohr KJ, Gratzl M, Mayerhofer A. 2003. Molecular and physiological evidence for functional gamma-aminobutyric acid (GABA)-C receptors in growth hormone-secreting cells. *J Biol Chem* **278**, 20192-5.
91. Gao F, Mer G, Tonelli M, Hansen SB, Burghardt TP, Taylor P, Sine SM. 2006. Solution NMR of acetylcholine binding protein reveals agonist-mediated conformational change of the C-loop. *Mol Pharmacol* **70**, 1230-5.
92. Gee VJ, Kracun S, Cooper ST, Gibb AJ, Millar NS. 2007. Identification of domains influencing assembly and ion channel properties in alpha 7 nicotinic receptor and 5-HT3 receptor subunit chimaeras. *Br J Pharmacol* **152**, 501-12.
93. Gordon D, Krishnamurthy V, Chung SH. 2009. Generalized Langevin models of molecular dynamics simulations with applications to ion channels. *J Chem Phys* **131**, 134102.
94. Goren EN, Reeves DC, Akabas MH. 2004. Loose protein packing around the extracellular half of the GABA(A) receptor beta1 subunit M2 channel-lining segment. *J Biol Chem* **279**, 11198-205.
95. Gotti C, Clementi F, Fornari A, Gaimarri A, Guiducci S, Manfredi I, Moretti M, Pedrazzi P, Pucci L, Zoli M. 2009. Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochem Pharmacol* **78**, 703-11.
96. Goutman JD, Escobar AL, Calvo DJ. 2005. Analysis of macroscopic ionic currents mediated by GABArho1 receptors during lanthanide modulation predicts novel states controlling channel gating. *Br J Pharmacol* **146**, 1000-9.
97. Grazioso G, Pomè DY, Matera C, Frigerio F, Pucci L, Gotti C, Dallanocce C, De Amici M. 2009. Design of novel alpha7-subtype-preferring nicotinic acetylcholine receptor agonists: application of docking and MM-PBSA computational approaches, synthetic and pharmacological studies. *Bioorg Med Chem Lett* **19**, 6353-7.

98. Greka A, Lipton SA, Zhang D. 2000. Expression of GABA(C) receptor rho1 and rho2 subunits during development of the mouse retina. *Eur J Neurosci* **12**, 3575-82.
99. Grenningloh G, Rienitz A, Schmitt B, Methfessel C, Zensen M, Beyreuther K, Gundelfinger ED, Betz H. 1987. The strychnine-binding subunit of the glycine receptor shows homology with nicotinic acetylcholine receptors. *Nature* **328**, 215-20.
100. Grosman C, Salamone FN, Sine SM, Auerbach A. 2000. The extracellular linker of muscle acetylcholine receptor channels is a gating control element. *J Gen Physiol* **116**, 327-40.
101. Guex N, Peitsch MC. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714-23.
102. Gunthorpe MJ, Lummis SC. 2001. Conversion of the ion selectivity of the 5-HT(3a) receptor from cationic to anionic reveals a conserved feature of the ligand-gated ion channel superfamily. *J Biol Chem* **276**, 10977-83.
103. Gunthorpe MJ, Peters JA, Gill CH, Lambert JJ, Lummis SC. 2000. The 4'lysine in the putative channel lining domain affects desensitization but not the single-channel conductance of recombinant homomeric 5-HT3A receptors. *J Physiol* **522**, 187-98.
104. Haddadian EJ, Cheng MH, Coalson RD, Xu Y, Tang P. 2008. In silico models for the human alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor. *J Phys Chem B* **112**, 13981-90.
105. Haeger S, Kuzmin D, Detro-Dassen S, Lang N, Kilb M, Tsetlin V, Betz H, Laube B, Schmalzing G. 2010. An intramembrane aromatic network determines pentameric assembly of Cys-loop receptors. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 90-8.
106. Hales TG, Deeb TZ, Tang H, Bolland KA, King DP, Johnson SJ, Connolly CN. 2006. An asymmetric contribution to gamma-aminobutyric type A receptor function of a conserved lysine within TM2-3 of alpha1, beta2, and gamma2 subunits. *J Biol Chem* **281**, 17034-43.
107. Hanley JG, Koulen P, Bedford F, Gordon-Weeks PR, Moss SJ. 1999. The protein MAP-1B links GABA(C) receptors to the cytoskeleton at retinal synapses. *Nature* **397**, 66-9.
108. Hansen SB, Sulzenbacher G, Huxford T, Marchot P, Taylor P, Bourne Y. 2005. Structures of Aplysia AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations. *EMBO J* **24**, 3635-46.
109. Hansen SB, Wang HL, Taylor P, Sine SM. 2008. An ion selectivity filter in the extracellular domain of Cys-loop receptors reveals determinants for ion conductance. *J Biol Chem* **283**, 36066-70.
110. Harrison NJ, Lummis SC. 2006. Molecular modeling of the GABA(C) receptor ligand-binding domain. *J Mol Model* **12**, 317-24.
111. Hedblom E, Kirkness EF. 1997. A novel class of GABAA receptor subunit in tissues of the reproductive system. *J Biol Chem* **272**, 15346-50.
112. Hilf RJ, Dutzler R. 2008. X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* **452**, 375-9.
113. Hilf RJ, Dutzler R. 2009. Structure of a potentially open state of a proton-activated pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* **457**, 115-8.
114. Hinton T, Chebib M, Johnston GA. 2008. Enantioselective actions of 4-amino-3-hydroxybutanoic acid and (3-amino-2-hydroxypropyl)methylphosphinic acid at recombinant GABA(C) receptors. *Bioorg Med Chem Lett* **18**, 402-4.

- 115.Hogg RC, Bertrand D. 2004. What genes tell us about nicotine addiction. *Science* **306**, 983-5.
- 116.Houamed KM, Bilbe G, Smart TG, Constanti A, Brown DA, Barnard EA, Richards BM. 1984. Expression of functional GABA, glycine and glutamate receptors in *Xenopus* oocytes injected with rat brain mRNA. *Nature* **310**, 318-21
- 117.Huang DM, Sendner C, Horinek D, Netz RR, Bocquet L. 2008. Water slippage versus contact angle: a quasiuniversal relationship. *Phys Rev Lett* **101**, 226101.
- 118.Huang RQ, Dillon GH. 1999. Effect of extracellular pH on GABA-activated current in rat recombinant receptors and thin hypothalamic slices. *J Neurophysiol* **82**, 1233-43.
- 119.Hucho F, Hilgenfeld R. 1989. The selectivity filter of a ligand-gated ion channel. The helix-M2 model of the ion channel of the nicotinic acetylcholine receptor. *FEBS Lett* **257**, 17-23.
- 120.Hull C, Li GL, von Gersdorff H. 2006. GABA transporters regulate a standing GABAC receptor-mediated current at a retinal presynaptic terminal. *J Neurosci* **26**, 6979-84.
- 121.Ichikawa K, Izumi M, Goto D, Ito N. 2001. Selective encapsulation of chloride ions within novel cage host complexes in the presence of equimolar amounts of chloride and bromide ions. *Chemistry* **7**, 5094-8.
- 122.Ichinose T, Lukasiewicz PD. 2002. GABA transporters regulate inhibition in the retina by limiting GABA(C) receptor activation. *J Neurosci* **22**, 3285-92.
- 123.Ippolito JA, Alexander RS, Christianson DW. 1990. Hydrogen bond stereochemistry in protein structure and function. *J Mol Biol* **215**, 457-71.
- 124.Ivanov I, Cheng X, Sine SM, McCammon JA. 2007. Barriers to ion translocation in cationic and anionic receptors from the Cys-loop family. *J Am Chem Soc* **129**, 8217-24.
- 125.Jansen M, Bali M, Akabas MH. 2008. Modular design of Cys-loop ligand-gated ion channels: functional 5-HT<sub>3</sub> and GABA rho1 receptors lacking the large cytoplasmic M3M4 loop. *J Gen Physiol* **131**, 137-46.
- 126.Jarvis MF, Khakh BS. 2009. ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology* **56**, 208-15.
- 127.Jenkins A, Andreasen A, Trudell JR, Harrison NL. 2002. Tryptophan scanning mutagenesis in TM4 of the GABA(A) receptor alpha1 subunit: implications for modulation by inhaled anesthetics and ion channel structure. *Neuropharmacology* **43**, 669-78.
- 128.Jensen ML, Pedersen LN, Timmermann DB, Schousboe A, Ahring PK. 2005. Mutational studies using a cation-conducting GABAA receptor reveal the selectivity determinants of the Cys-loop family of ligand-gated ion channels. *J Neurochem* **92**, 962-72.
- 129.Jensen ML, Timmermann DB, Johansen TH, Schousboe A, Varming T, Ahring PK. 2002. The beta subunit determines the ion selectivity of the GABAA receptor. *J Biol Chem* **277**, 41438-47.
- 130.Jha A, Cadugan DJ, Purohit P, Auerbach A. 2007. Acetylcholine receptor gating at extracellular transmembrane domain interface: the cys-loop and M2-M3 linker. *J Gen Physiol* **130**, 547-58.
- 131.Jost B, Grabert J, Patz S, Schmidt M, Wahle P. 2006. GABAC receptor subunit mRNA expression in the rat superior colliculus is regulated by calcium channels, neurotrophins, and GABAC receptor activity. *Brain Cell Biol* **35**, 251-66.

132. Jung S, Harris RA. 2006. Sites in TM2 and 3 are critical for alcohol-induced conformational changes in GABA receptors. *J Neurochem* **96**, 885-92.
133. Kash TL, Kim T, Trudell JR, Harrison NL. 2004. Evaluation of a proposed mechanism of ligand-gated ion channel activation in the GABAA and glycine receptors. *Neurosci Lett* **371**, 230-4.
134. Kasheverov IE, Utkin YN, Tsetlin VI. 2009. Naturally occurring and synthetic peptides acting on nicotinic acetylcholine receptors. *Curr Pharm Des* **15**, 2430-52.
135. Kelley SP, Dunlop JI, Kirkness EF, Lambert JJ, Peters JA. 2003. A cytoplasmic region determines single-channel conductance in 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Nature* **424**, 321-4.
136. Keramidas A, Moorhouse AJ, French CR, Schofield PR, Barry PH. 2000. M2 pore mutations convert the glycine receptor channel from being anion- to cation-selective. *Biophys J* **79**, 247-59.
137. Keramidas A, Moorhouse AJ, Pierce KD, Schofield PR, Barry PH. 2002. Cation-selective mutations in the M2 domain of the inhibitory glycine receptor channel reveal determinants of ion-charge selectivity. *J Gen Physiol* **119**, 393-410.
138. Khalili-Araghi F, Gumbart J, Wen PC, Sotomayor M, Tajkhorshid E, Schulten K. 2009. Molecular dynamics simulations of membrane channels and transporters. *Curr Opin Struct Biol* **19**, 128-37.
139. Kiefer F, Arnold K, Künzli M, Bordoli L, Schwede T (2009). The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Research* **37**, 387-92.
140. Kirischuk S, Akyeli J, Iosub R, Grantyn R. 2003. Pre- and postsynaptic contribution of GABAC receptors to GABAergic synaptic transmission in rat collicular slices and cultures. *Eur J Neurosci* **18**, 752-8.
141. Korpi ER, Mihalek RM, Sinkkonen ST, Hauer B, Hevers W, Homanics GE, Sieghart W, Lüddens H. 2002. Altered receptor subtypes in the forebrain of GABA(A) receptor delta subunit-deficient mice: recruitment of gamma 2 subunits. *Neuroscience* **109**, 733-43.
142. Koulen P, Brandstätter JH, Enz R, Bormann J, Wässle H. 1998. Synaptic clustering of GABA(C) receptor rho-subunits in the rat retina. *Eur J Neurosci* **10**, 115-27.
143. Kracun S, Harkness PC, Gibb AJ, Millar NS. 2008. Influence of the M3-M4 intracellular domain upon nicotinic acetylcholine receptor assembly, targeting and function. *Br J Pharmacol* **153**, 1474-84.
144. Krieger E, Vriend G. 2002. Models@Home: distributed computing in bioinformatics using a screensaver based approach. *Bioinformatics* **18**, 315-8.
145. Kusama T, Hatama K, Sakurai M, Kizawa Y, Uhl GR, Murakami H. 1998. Consensus phosphorylation sites of human GABA(c)/GABArho receptors are not critical for inhibition by protein kinase C activation. *Neurosci Lett* **255**, 17-20.
146. Kusama T, Sakurai M, Kizawa Y, Uhl GR, Murakami H. 1995. GABA rho1 receptor: inhibition by protein kinase C activators. *Eur J Pharmacol* **291**, 431-4.
147. Kusano K, Miledi R, Stinnakre J. 1977. Acetylcholine receptors in the oocyte membrane. *Nature* **270**, 739-41.
148. Kusano K, Miledi R, Stinnakre J. 1982. Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus* oocyte membrane. *J Physiol* **328**, 143-70.

149. Lambert C, Leonard N, De Bolle X, Depiereux E. 2002. ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures. *Bioinformatics* **18**, 1250-6.
150. Lape R, Colquhoun D, Sivilotti LG. 2008. On the nature of partial agonism in the nicotinic receptor superfamily. *Nature* **454**, 722-7.
151. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* **23**, 2947-8.
152. Lasalde JA, Tamamizu S, Butler DH, Vibat CR, Hung B, McNamee MG. 1996. Tryptophan substitutions at the lipid-exposed transmembrane segment M4 of Torpedo californica acetylcholine receptor govern channel gating. *Biochemistry* **35**, 14139-48.
153. Law RJ, Lightstone FC. 2009. Modeling neuronal nicotinic and GABA receptors: important interface salt-links and protein dynamics. *Biophys J* **97**, 1586-94.
154. Le Novère N, Changeux JP. 1995. Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J Mol Evol* **40**, 155-72.
155. Le Novère N, Changeux JP. 1999. The Ligand Gated Ion Channel Database. *Nucleic Acids Res* **27**, 340-2.
156. Lee DJ, Keramidas A, Moorhouse AJ, Schofield PR, Barry PH. 2003. The contribution of proline 250 (P-2') to pore diameter and ion selectivity in the human glycine receptor channel. *Neurosci Lett* **351**, 196-200.
157. Lee HK, Gwalani L, Mishra V, Anandjiwala P, Sala F, Sala S, Ballesta JJ, O'Malley D, Criado M, Loring RH. 2009. Investigating the role of protein folding and assembly in cell-type dependent expression of alpha7 nicotinic receptors using a green fluorescent protein chimera. *Brain Res* **1259**, 7-16.
158. Lee YH, Li L, Lasalde J, Rojas L, McNamee M, Ortiz-Miranda SI, Pappone P. 1994. Mutations in the M4 domain of Torpedo californica acetylcholine receptor dramatically alter ion channel function. *Biophys J* **66**, 646-53.
159. Levitt M. 1983. Protein folding by restrained energy minimization and molecular dynamics. *J Mol Biol* **170**, 723-64.
160. Li S, Zhang Y, Liu H, Yan Y, Li Y. 2008. Identification and expression of GABAC receptor in rat testis and spermatozoa. *Acta Biochim Biophys Sin* **40**, 761-7.
161. Liu GY, Ju XL, Cheng J. 2009. Selectivity of Imidacloprid for fruit fly versus rat nicotinic acetylcholine receptors by molecular modeling. *J Mol Model*. 2009 en prensa.
162. Liu LT, Haddadian EJ, Willenbring D, Xu Y, Tang P. 2009. Higher Susceptibility to Halothane Modulation in Open- Than in Closed-Channel alpha4beta2 nAChR Revealed by Molecular Dynamics Simulations. *J Phys Chem B*. 2009 en prensa.
163. Lobo IA, Trudell JR, Harris RA. 2006. Accessibility to residues in transmembrane segment four of the glycine receptor. *Neuropharmacology* **50**, 174-81.
164. Lodge D. 2009. The history of the pharmacology and cloning of ionotropic glutamate receptors and the development of idiosyncratic nomenclature. *Neuropharmacology* **56**, 6-21.

165. López-Chávez A, Miledi R, Martínez-Torres A. 2005. Cloning and functional expression of the bovine GABA(C) rho2 subunit. Molecular evidence of a widespread distribution in the CNS. *Neurosci Res* **53**, 421-7.
166. López-Vera E, Aguilar MB, Schiavon E, Marinzi C, Ortiz E, Restano Cassulini R, Batista CV, Possani LD, Heimer de la Cotera EP, Peri F, Becerril B, Wanke E. 2007. Novel alpha-conotoxins from *Conus spurius* and the alpha-conotoxin EI share high-affinity potentiation and low-affinity inhibition of nicotinic acetylcholine receptors. *FEBS J* **274**, 3972-85.
167. Lummis SC, L Beene D, Harrison NJ, Lester HA, Dougherty DA. 2005. A cation-pi binding interaction with a tyrosine in the binding site of the GABAC receptor. *Chem Biol* **12**, 993-7.
168. Lummis SC. 2009. Locating GABA in GABA receptor binding sites. *Biochem Soc Trans* **37**, 1343-6.
169. Lund O, Nielsen M, Lundegaard C, Worning P. 2002. CPHmodels 2.0: X3M a Computer Program to Extract 3D Models. *The CASP5 conference* **102**, 2002.
170. Luttmann E, Ludwig J, Höffle-Maas A, Samochocki M, Maelicke A, Fels G. 2009. Structural model for the binding sites of allosterically potentiating ligands on nicotinic acetylcholine receptors. *ChemMedChem* **4**, 1874-82.
171. Lynch JW. 2009. Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology* **56**, 303-9.
172. Mamalaki C, Stephenson FA, Barnard EA. 1987. The GABAA/benzodiazepine receptor is a heterotetramer of homologous alpha and beta subunits. *EMBO J* **6**, 561-5.
173. Martínez-Torres A, Demuro A, Miledi R. 2000. GABArho 1/GABAAalpha 1 receptor chimeras to study receptor desensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3562-6.
174. Martínez-Torres A, Miledi R. 2004. A single amino acid change within the ion-channel domain of the gamma-aminobutyric acid rho1 receptor accelerates desensitization and increases taurine agonism. *Arch Med Res* **35**, 194-8.
175. Maskos U. 2007. Emerging concepts: novel integration of in vivo approaches to localize the function of nicotinic receptors. *J Neurochem* **100**, 596-602.
176. McCall MA, Lukasiwicz PD, Gregg RG, Peachey NS. 2002. Elimination of the rho1 subunit abolishes GABA(C) receptor expression and alters visual processing in the mouse retina. *J Neurosci* **22**, 4163-74.
177. Melis C, Lummis SC, Molteni C. 2008. Molecular dynamics simulations of GABA binding to the GABAC receptor: the role of Arg104. *Biophys J* **95**, 4115-23.
178. Mihic SJ, Harris RA. 1996. Inhibition of rho1 receptor GABAergic currents by alcohols and volatile anesthetics. *J Pharmacol Exp Ther* **277**, 411-6.
179. Mihic SJ, Ye Q, Wick MJ, Koltchine VV, Krasowski MD, Finn SE, Mascia MP, Valenzuela CF, Hanson KK, Greenblatt EP, Harris RA, Harrison NL. 1997. Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors. *Nature* **389**, 385-9.
180. Miledi R, Parker I, Sumikawa K. 1982. Properties of acetylcholine receptors translated by cat muscle mRNA in *Xenopus* oocytes. *EMBO J* **1982**, 1307-12.
181. Miledi R. 1982. A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **215**, 491-7.
182. Millar NS, Gotti C. 2009. Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* **56**, 237-46.

183. Miller AS, Falke JJ. 2004. Side chains at the membrane-water interface modulate the signaling state of a transmembrane receptor. *Biochemistry* **43**, 1763-70.
184. Mitra A, Bailey TD, Auerbach AL. 2004. Structural dynamics of the M4 transmembrane segment during acetylcholine receptor gating. *Structure* **12**, 1909-18.
185. 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.
186. Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N. 2003. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* **423**, 949-55.
187. Mizukami K, Ikonovic MD, Grayson DR, Sheffield R, Armstrong DM. 1998. Immunohistochemical study of GABA<sub>A</sub> receptor alpha1 subunit in the hippocampal formation of aged brains with Alzheimer-related neuropathologic changes. *Brain Res* **799**, 148-55.
188. Mody I, Pearce RA. 2004. Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA(A) receptors. *Trends Neurosci* **27**, 569-75.
189. Möhler H. 2009. Role of GABA<sub>A</sub> receptors in cognition. *Biochem Soc Trans* **37**, 1328-33.
190. Moulton PR. 2009. Neuronal glutamate and GABA<sub>A</sub> receptor function in health and disease. *Biochem Soc Trans* **37**, 1317-22.
191. Mudo G, Belluardo N, Fuxe K. 2007. Nicotinic receptor agonists as neuroprotective/neurotrophic drugs. Progress in molecular mechanisms. *J Neural Transm* **114**, 135-47.
192. Mukhtasimova N, Free C, Sine SM. 2005. Initial coupling of binding to gating mediated by conserved residues in the muscle nicotinic receptor. *J Gen Physiol* **126**, 23-39.
193. Nagy PI, Flock M, Ramek M. 1997. Theoretical studies on the conformational equilibria of the  $\gamma$ -hydroxybutyric acid in the gas phase and in solution. *J Phys Chem A* **101**, 5942-8.
194. Nakayama Y, Hattori N, Otani H, Inagaki C. 2006. Gamma-aminobutyric acid (GABA)-C receptor stimulation increases prolactin (PRL) secretion in cultured rat anterior pituitary cells. *Biochem Pharmacol* **71**, 1705-10.
195. Narahashi T. 2000. Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: past, present, and future. *J Pharmacol Exp Ther* **294**, 1-26.
196. Nicholson LF, Faull RL, Waldvogel HJ, Dragunow M. 1995. GABA and GABA<sub>A</sub> receptor changes in the substantia nigra of the rat following quinolinic acid lesions in the striatum closely resemble Huntington's disease. *Neuroscience* **66**, 507-21.
197. Nishizaki T. 2003. N-glycosylation sites on the nicotinic ACh receptor subunits regulate receptor channel desensitization and conductance. *Brain Res Mol Brain Res* **114**, 172-6.
198. Nonner W, Chen DP, Eisenberg B. 1998. Anomalous mole fraction effect, electrostatics, and binding in ionic channels. *Biophys J* **74**, 2327-34.
199. Numa S. 1988. A molecular view of neurotransmitter receptors and ionic channels. *Harvey Lect* **83**, 121-65.
200. Ollila OH, Risselada HJ, Louhivuori M, Lindahl E, Vattulainen I, Marrink SJ. 2009. 3D pressure field in lipid membranes and membrane-protein complexes. *Phys Rev Lett* **102**, 078101.

201. Olsen RW, Sieghart W. 2008. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. *Pharmacol Rev* **60**, 243-60.
202. Olsen RW, Sieghart W. 2009. GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* **56**, 141-8.
203. Oron Y, Dascal N, Nadler E, Lupu M. 1985. Inositol 1,4,5-trisphosphate mimics muscarinic response in *Xenopus* oocytes. *Nature* **313**, 141-3.
204. Ortiz-Miranda SI, Lasalde JA, Pappone PA, McNamee MG. 1997. Mutations in the M4 domain of the Torpedo californica nicotinic acetylcholine receptor alter channel opening and closing. *J Membr Biol* **158**, 17-30.
205. O'Shea SM, Williams CA, Jenkins A. 2009. Inverse effects on gating and modulation caused by a mutation in the M2-M3 Linker of the GABA(A) receptor gamma subunit. *Mol Pharmacol* **76**, 641-51.
206. Osolodkin DI, Chupakhin VI, Palyulin VA, Zefirov NS. 2009. Molecular modeling of ligand-receptor interactions in GABA C receptor. *J Mol Graph Model* **27**, 813-21.
207. Paas Y, Gibor G, Grailhe R, Savatier-Duclert N, Dufresne V, Sunesen M, de Carvalho LP, Changeux JP, Attali B. 2005. Pore conformations and gating mechanism of a Cys-loop receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15877-82.
208. Padgett CL, Hanek AP, Lester HA, Dougherty DA, Lummis SC. 2007. Unnatural amino acid mutagenesis of the GABA(A) receptor binding site residues reveals a novel cation-pi interaction between GABA and beta 2Tyr97. *J Neurosci* **27**, 886-92.
209. Pan ZH, Zhang D, Zhang X, Lipton SA. 1997. Agonist-induced closure of constitutively open gamma-aminobutyric acid channels with mutated M2 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6490-5.
210. Panicker S, Cruz H, Arrabit C, Slesinger PA. 2002. Panicker S, Cruz H, Arrabit C, Slesinger PA. *J Neurosci* **22**, 1629-39.
211. Parker I, Gundersen CB, Miledi R. 1986. Actions of pentobarbital on rat brain receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci* **6**, 2290-7.
212. Parker I, Miledi R. 1986. Changes in intracellular calcium and in membrane currents evoked by injection of inositol trisphosphate into *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **228**, 307-15.
213. Parker I, Sumikawa K, Miledi R. 1988. Responses to GABA, glycine and beta-alanine induced in *Xenopus* oocytes by messenger RNA from chick and rat brain. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **233**, 201-16.
214. Parthiban M, Rajasekaran MB, Ramakumar S, Shanmughavel P. 2009. Molecular modeling of human pentameric alpha(7) neuronal nicotinic acetylcholine receptor and its interaction with its agonist and competitive antagonist. *J Biomol Struct Dyn* **26**, 535-47.
215. Pascual JM, Karlin A. 1998. State-dependent accessibility and electrostatic potential in the channel of the acetylcholine receptor. Inferences from rates of reaction of thiosulfonates with substituted cysteines in the M2 segment of the alpha subunit. *J Gen Physiol* **111**, 717-39.
216. Pattnaik B, Jellali A, Sahel J, Dreyfus H, Picaud S. 2000. GABAC receptors are localized with microtubule-associated protein 1B in mammalian cone photoreceptors. *J Neurosci* **20**, 6789-96.
217. Peters JA, Cooper MA, Carland JE, Livesey MR, Hales TG, Lambert JJ. 2010. Novel structural determinants of single channel conductance and ion selectivity

- in 5-hydroxytryptamine-type3 and nicotinic acetylcholine receptors. *J Physiol*, **588**, 587-96.
218. Pezeshki S, Chimere C, Bessonov AN, Winterhalter M, Kleinekathöfer U. 2009. Understanding ion conductance on a molecular level: an all-atom modeling of the bacterial porin OmpF. *Biophys J* **97**, 1898-906.
219. Piao WH, Campagnolo D, Dayao C, Lukas RJ, Wu J, Shi FD. 2009. Nicotine and inflammatory neurological disorders. *Acta Pharmacol Sin* **30**, 715-22.
220. Polenzani L, Woodward RM, Miledi R. 1991. Expression of mammalian gamma-aminobutyric acid receptors with distinct pharmacology in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 4318-22.
221. Pons S, Sallette J, Bourgeois JP, Taly A, Changeux JP, Devillers-Thiéry A. 2004. Critical role of the C-terminal segment in the maturation and export to the cell surface of the homopentameric alpha 7-5HT3A receptor. *Eur J Neurosci* **20**, 2022-30.
222. Portella G, de Groot BL. 2009. Determinants of water permeability through nanoscopic hydrophilic channels. *Biophys J* **96**, 925-38.
223. Price KL, Millen KS, Lummis SC. 2007. Transducing agonist binding to channel gating involves different interactions in 5-HT3 and GABAC receptors. *J Biol Chem* **282**, 25623-30.
224. Purohit P, Auerbach A. 2007. Acetylcholine receptor gating at extracellular transmembrane domain interface: the "pre-M1" linker. *J Gen Physiol* **130**, 559-68.
225. Qian H, Pan Y, Choi B, Ripps H. 2006. High pH accelerates GABA deactivation on perch-rho1B receptors. *Neuroscience* **142**, 1221-30.
226. Rahman S, López-Hernández GY, Corrigan WA, Papke RL. 2008. Neuronal nicotinic receptors as brain targets for pharmacotherapy of drug addiction. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **7**, 422-41.
227. Reid CA, Berkovic SF, Petrou S. 2009. Mechanisms of human inherited epilepsies. *Prog Neurobiol* **87**, 41-57.
228. Revah F, Bertrand D, Galzi JL, Devillers-Thiéry A, Mulle C, Hussy N, Bertrand S, Ballivet M, Changeux JP. 1991. *Nature* **353**, 846-9.
229. Reyes-Ruiz JM, Ochoa-de la Paz LD, Martínez-Torres A, Miledi R. 2010. Functional impact of serial deletions at the C-terminus of the human GABA $\rho$ 1 receptor. *Biochim Biophys Acta* **1798**, 1002-7.
230. Rivera C, Wegelius K, Reeben M, Kaila K, Michael Pasternack. 2000. Different sensitivities of human and rat rho(1) GABA receptors to extracellular pH. *Neuropharmacology* **39**, 977-89.
231. Roccamo AM, Barrantes FJ. 2007. Charged amino acid motifs flanking each extreme of the alphaM4 transmembrane domain are involved in assembly and cell-surface targeting of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *J Neurosci Res* **85**, 285-93.
232. Romanelli MN, Gratteri P, Guandalini L, Martini E, Bonaccini C, Gualtieri F. 2007. Central nicotinic receptors: structure, function, ligands, and therapeutic potential. *ChemMedChem* **2**, 746-67.
233. Rosas-Arellano A, Ochoa-de la Paz LD, Miledi R, Martínez-Torres A. 2006. Rosas-Arellano A, Ochoa-de la Paz LD, Miledi R, Martínez-Torres A. *Neurosci Res* **57**, 347-53.
234. Roth R, Gillespie D, Nonner W, Eisenberg RE. 2008. Bubbles, gating, and anesthetics in ion channels. *Biophys J* **94**, 4282-98.

235. Rozzo A, Armellin M, Franzot J, Chiaruttini C, Nistri A, Tongiorgi E. 2002. Expression and dendritic mRNA localization of GABAC receptor rho1 and rho2 subunits in developing rat brain and spinal cord. *Eur J Neurosci* **15**, 1747-58.
236. Rucktooa P, Smit AB, Sixma TK. 2009. Insight in nAChR subtype selectivity from AChBP crystal structures. *Biochem Pharmacol* **78**, 777-87.
237. Sankararamkrishnan R, Adcock C, Sansom MS. 1996. The pore domain of the nicotinic acetylcholine receptor: molecular modeling, pore dimensions, and electrostatics. *Biophys J* **71**, 1659-71.
238. Sansom MS, Shrivastava IH, Ranatunga KM, Smith GR. 2000. Simulations of ion channels--watching ions and water move. *Trends Biochem Sci* **25**, 368-74.
239. Santhakumar V, Wallner M, Otis TS. 2007. Ethanol acts directly on extrasynaptic subtypes of GABAA receptors to increase tonic inhibition. *Alcohol* **41**, 211-21.
240. Schlicker K, Boller M, Schmidt M. 2004. GABAC receptor mediated inhibition in acutely isolated neurons of the rat dorsal lateral geniculate nucleus. *Brain Res Bull* **63**, 91-7.
241. Schofield PR, Darlison MG, Fujita N, Burt DR, Stephenson FA, Rodriguez H, Rhee LM, Ramachandran J, Reale V, Glencorse TA, Seeburg PH, Barnard EA. 1987. Sequence and functional expression of the GABA A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature* **328**, 221-7.
242. Sedelnikova A, Smith CD, Zakharkin SO, Davis D, Weiss DS, Chang Y. 2005. Mapping the rho1 GABA(C) receptor agonist binding pocket. Constructing a complete model. *J Biol Chem* **280**, 1535-42.
243. Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, Silver RA. 2004. Tonic active GABA A receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends Neurosci* **27**, 262-9.
244. Sharma G, Vijayaraghavan S. 2008. Nicotinic receptors containing the alpha7 subunit: a model for rational drug design. *Curr Med Chem* **15**, 2921-32.
245. Shields CR, Tran MN, Wong RO, Lukasiewicz PD. 2000. Distinct ionotropic GABA receptors mediate presynaptic and postsynaptic inhibition in retinal bipolar cells. *J Neurosci* **20**, 2673-82.
246. Shimada S, Cutting G, Uhl GR. 1991. Cloning of the gamma-aminobutyric acid (GABA) rho 1 DNAc: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2673-7.
247. Sieghart W. 2006. Structure, pharmacology, and function of GABAA receptor subtypes. *Adv Pharmacol* **54**, 231-63.
248. Sigel E, Baur R. 1988. Allosteric modulation by benzodiazepine receptor ligands of the GABAA receptor channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci* **8**, 289-95.
249. Sine SM, Engel AG. 2006. Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature* **440**, 448-55.
250. Smart TG, Houamed KM, Van Renterghem C, Constanti A. 1987. mRNA-directed synthesis and insertion of functional amino acid receptors in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem Soc Trans* **15**, 117-22.
251. Smith GB, Olsen RW. 1995. Functional domains of GABAA receptors. *Trends Pharmacol Sci* **16**, 162-8.
252. Song XQ, Meng F, Ramsey DJ, Ripps H, Qian H. 2005. The GABA rho1 subunit interacts with a cellular retinoic acid binding protein in mammalian retina. *Neuroscience* **136**, 467-75.

253. Speranskiy K, Cascio M, Kurnikova M. 2007. Homology modeling and molecular dynamics simulations of the glycine receptor ligand binding domain. *Proteins* **67**, 950-60.
254. Steinlein OK, Bertrand D. 2008. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: from the genetic analysis to neurological diseases. *Biochem Pharmacol* **76**, 1175-83.
255. Steinlein OK. 2007. Genetic disorders caused by mutated acetylcholine receptors. *Life Sci* **80**, 2186-90.
256. Stephenson FA, Duggan MJ, Pollard S. 1990. The gamma 2 subunit is an integral component of the gamma-aminobutyric acidA receptor but the alpha 1 polypeptide is the principal site of the agonist benzodiazepine photoaffinity labeling reaction. *J Biol Chem* **265**, 21160-5.
257. Swope SL, Moss SJ, Blackstone CD, Haganir RL. 1992. Phosphorylation of ligand-gated ion channels: a possible mode of synaptic plasticity. *FASEB J* **6**, 2514-23.
258. Tai K, Fowler P, Mokrab Y, Stansfeld P, Sansom MS. 2008. Molecular modeling and simulation studies of ion channel structures, dynamics and mechanisms. *Methods Cell Biol* **90**, 233-65.
259. Taly A, Corringer PJ, Guedin D, Lestage P, Changeux JP. 2009. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 733-50.
260. Tamamizu S, Lee Y, Hung B, McNamee MG, Lasalde-Dominicci JA. 1999. Alteration in ion channel function of mouse nicotinic acetylcholine receptor by mutations in the M4 transmembrane domain. *J Membr Biol* **170**, 157-64.
261. Tasneem A, Iyer LM, Jakobsson E, Aravind L. 2005. Identification of the prokaryotic ligand-gated ion channels and their implications for the mechanisms and origins of animal Cys-loop ion channels. *Genome Biol* **6**, R4.
262. Taylor P, Talley TT, Radic' Z, Hansen SB, Hibbs RE, Shi J. 2007. Structure-guided drug design: conferring selectivity among neuronal nicotinic receptor and acetylcholine-binding protein subtypes. *Biochem Pharmacol* **74**, 1164-71.
263. Tierney ML, Luu T, Gage PW. 2008. Functional asymmetry of the conserved cysteine loops in alphabeta gamma GABA A receptors revealed by the response to GABA activation and drug potentiation. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 968-79.
264. Tombaugh GC, Somjen GG. 1996. Effects of extracellular pH on voltage-gated Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents in isolated rat CA1 neurons. *J Physiol* **493**, 719-32.
265. Torres VI, Weiss DS. 2002. Identification of a tyrosine in the agonist binding site of the homomeric rho1 gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor that, when mutated, produces spontaneous opening. *J Biol Chem* **277**, 43741-8.
266. Trudell JR, Bertaccini E. 2004. Comparative modeling of a GABAA alpha1 receptor using three crystal structures as templates. *J Mol Graph Model* **23**, 39-49.
267. Ueno S, Wick MJ, Ye Q, Harrison NL, Harris RA. 1999. Ueno S, Wick MJ, Ye Q, Harrison NL, Harris RA. *Br J Pharmacol* **127**, 377-82.
268. Ulens C, Akdemir A, Jongejan A, van Elk R, Bertrand S, Perrakis A, Leurs R, Smit AB, Sixma TK, Bertrand D, de Esch IJ. 2009. Use of acetylcholine binding protein in the search for novel alpha7 nicotinic receptor ligands. In silico docking, pharmacological screening, and X-ray analysis. *J Med Chem* **52**, 2372-83.
269. Ulens C, Hogg RC, Celie PH, Bertrand D, Tsetlin V, Smit AB, Sixma TK. 2006. Structural determinants of selective alpha-conotoxin binding to a nicotinic

- acetylcholine receptor homolog AChBP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3615-20.
270. Unwin N. 2002. Structure of the acetylcholine-gated channel. *Novartis Found Symp* **245**, 5-15.
271. Unwin N. 2005. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J Mol Biol* **346**, 967-89.
272. Vaquero CF, de la Villa P. 1999. Localisation of the GABA(C) receptors at the axon terminal of the rod bipolar cells of the mouse retina. *Neurosci Res* **35**, 1-7.
273. Vernino S, Hopkins S, Wang Z. 2009. Autonomic ganglia, acetylcholine receptor antibodies, and autoimmune ganglionopathy. *Auton Neurosci* **146**, 3-7.
274. Villmann C, Oertel J, Ma-Högemeier ZL, Hollmann M, Sprengel R, Becker K, Breitinger HG, Becker CM. 2009. Functional complementation of Glra1 (spd-ot), a glycine receptor subunit mutant, by independently expressed C-terminal domains. *J Neurosci* **29**, 2440-52.
275. von Heijne G, Gavel Y. 1988. Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur J Biochem* **174**, 671-8.
276. Walters RJ, Hadley SH, Morris KD, Amin J. 2000. Benzodiazepines act on GABAA receptors via two distinct and separable mechanisms. *Nat Neurosci* **3**, 1274-81.
277. Wang F, Imoto K. 1992. Pore size and negative charge as structural determinants of permeability in the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor channel. *Proc Biol Sci* **250**, 11-7.
278. Wang J, Lester HA, Dougherty DA. 2001. Establishing an ion pair interaction in the homomeric rho1 gamma-aminobutyric acid type A receptor that contributes to the gating pathway. *J Biol Chem* **282**, 26210-6.
279. Wang QW, Li ZW, Wang F, Yang JQ. 2001. Modulation by divalent cations of GABA rho 1 receptor from human retina expressed in *Xenopus* oocytes. *Biomed Environ Sci* **14**, 269-77.
280. Wang TL, Hackam A, Guggino WB, Cutting GR. 1995. A single histidine residue is essential for zinc inhibition of GABA rho 1 receptors. *J Neurosci* **15**, 7684-91.
281. Wegelius K, Pasternack M, Hiltunen JO, Rivera C, Kaila K, Saarma M, Reeben M. 1998. Distribution of GABA receptor rho subunit transcripts in the rat brain. *Eur J Neurosci* **10**, 350-7.
282. Weiland S, Witzemann V, Villarroel A, Propping P, Steinlein O. 1996. An amino acid exchange in the second transmembrane segment of a neuronal nicotinic receptor causes partial epilepsy by altering its desensitization kinetics. *FEBS Lett* **398**, 91-6.
283. Whiting PJ. 2003. GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery? *Drug Discov Today* **8**, 445-50.
284. Wiederstein M, Sippl MJ. 2007. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research* **35**, 407-10.
285. Wilson G, Karlin A. 2001. Acetylcholine receptor channel structure in the resting, open, and desensitized states probed with the substituted-cysteine-accessibility method. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1241-8.
286. Wotring VE, Chang Y, Weiss DS. 1999. Permeability and single channel conductance of human homomeric rho1 GABAC receptors. *J Physiol* **521**, 327-36.

287. Wotring VE, Miller TS, Weiss DS. 2003. Mutations at the GABA receptor selectivity filter: a possible role for effective charges. *J Physiol* **548**, 527-40.
288. Xiu X, Hanek AP, Wang J, Lester HA, Dougherty DA. 2005. A unified view of the role of electrostatic interactions in modulating the gating of Cys loop receptors. *J Biol Chem* **280**, 41655-66.
289. Xu M, Akabas MH. 1993. Amino acids lining the channel of the gamma-aminobutyric acid type A receptor identified by cysteine substitution. *J Biol Chem* **268**, 21505-8.
290. Xu M, Akabas MH. 1996. Identification of channel-lining residues in the M2 membrane-spanning segment of the GABA(A) receptor alpha1 subunit. *J Gen Physiol* **107**, 195-205.
291. Yakel JL, Jackson MB. 1988. 5-HT<sub>3</sub> receptors mediate rapid responses in cultured hippocampus and a clonal cell line. *Neuron* **1**, 615-21.
292. Yakel JL, Lagrutta A, Adelman JP, North RA. 1993. Single amino acid substitution affects desensitization of the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5030-3.
293. Yakel JL. 2009. Gating of nicotinic ACh receptors; latest insights into ligand binding and function. *J Physiol* en prensa.
294. Yang KC, Jin GZ, Wu J. 2009. Mysterious alpha6-containing nAChRs: function, pharmacology, and pathophysiology. *Acta Pharmacol Sin* **30**, 740-51.
295. Zhang D, Pan ZH, Awobuluyi M, Lipton SA. 2001. Structure and function of GABA(C) receptors: a comparison of native versus recombinant receptors. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 121-32.
296. Zhang J, Xue F, Chang Y. 2008. Structural determinants for antagonist pharmacology that distinguish the rho1 GABAC receptor from GABAA receptors. *Mol Pharmacol* **74**, 941-51.
297. Zhu F, Hummer G. 2009. Gating transition of pentameric ligand-gated ion channels. *Biophys J* **97**, 2456-63.
298. Zhu JJ, Lo FS. 1999. Three GABA receptor-mediated postsynaptic potentials in interneurons in the rat lateral geniculate nucleus. *J Neurosci* **19**, 5721-30.
299. Zhu Y, Ripps H, Qian H. 2007. A single amino acid in the second transmembrane domain of GABA rho receptors regulates channel conductance. *Neurosci Lett* **418**, 205-9.
300. Zouridakis M, Zisimopoulou P, Eliopoulos E, Poulas K, Tzartos SJ. 2009. Design and expression of human alpha7 nicotinic acetylcholine receptor extracellular domain mutants with enhanced solubility and ligand-binding properties. *Biochim Biophys Acta* **1794**, 355-66.