



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR-A

**PURIFICACIÓN, DISOCIACIÓN DE SUBUNIDADES E
INTERACCIÓN CON EL ANTICUERPO AE-1 DE LA
ACETILCOLINESTERASA DE SUERO FETAL BOVINO.
ENSAYOS CON PROTEÍNA QUINASA A.**

Memoria para aspirar al Grado de Doctor en Biología

César Flores Flores
1998

CAPÍTULO IV

INTERACCIÓN CON EL ANTICUERPO AE-1

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Los anticuerpos en el estudio de las colinesterasas

El conocimiento sobre la estructura y el mecanismo de acción de las colinesterasas ha mejorado considerablemente gracias a la obtención de anticuerpos contra estas enzimas. Las técnicas inmunológicas son útiles, por ejemplo, para cuantificar o purificar la AChE, así como para detectar la presencia de formas enzimáticas inactivas, cuya observación ha sido crucial a la hora de establecer la ruta de biosíntesis de las moléculas enzimáticas activas.

Aunque se conocen muchos métodos para medir los niveles de AChE basados en su capacidad para hidrolizar la ACh, los inmunoensayos ofrecen diversas ventajas. En algunas patologías se produce una disminución importante de la actividad colinesterásica en los tejidos. Tal disminución puede deberse a la ausencia total de la proteína o a la síntesis de formas aberrantes inactivas. Con la ayuda de los anticuerpos, es posible conocer el verdadero origen de la caída de actividad. Así, en los eritrocitos de pacientes con hemoglobinuria paroxismal nocturna, el empleo de los anticuerpos AE-1-AE-4 (Fambrough y col., 1982) ha permitido descubrir que la falta de actividad AChE se debe a la ausencia de enzima, y no a la presencia de AChE inactiva (Chow y col., 1985; Brimijoin y col., 1986). Mediante técnicas inmunológicas, el Dr. Rotundo demostró que una gran parte de la AChE que se sintetiza en miocitos de ave se degrada rápidamente antes de alcanzar el estado activo (Rotundo, 1984c; Rotundo, 1988). Por otra parte, los inmunoensayos facilitan la determinación de la actividad colinesterásica en medios donde su nivel es muy bajo, eliminando posibles interferencias por otras esterasas. Por ejemplo, el anticuerpo AE-2 se emplea para la determinación de AChE en el líquido amniótico, alcanzando un diagnóstico más seguro de defectos del tubo neural en fetos (Brock y col., 1985). La valoración de la actividad AChE del suero humano exige el uso de anticuerpos que reconozcan a la AChE y no a la

BuChE (mucho más abundante en dicha fuente), ya que la selectividad de los inhibidores de una u otra enzima no es completa y podría conducir a resultados erróneos (Tornel, 1992).

Las técnicas de cromatografía de inmutuafinidad son muy útiles para purificar la AChE, en especial cuando se emplean anticuerpos monoclonales. Se requiere un anticuerpo con alta afinidad por la AChE en unas condiciones, pero con baja en otras toleradas por la enzima. Con frecuencia, se utilizan tampones alcalinos para eluir la AChE de columnas con el anticuerpo ligado, ya que favorecen la disociación de los inmutuocomplejos sin apenas desnaturizar la enzima. Por cromatografía de inmutuafinidad se han purificado la AChE de cerebro de conejo (Mintz y Brimijoin, 1985), eritrocito humano (Brimijoin y col., 1986), elecrolaca de *Torpedo* (Sakai y col., 1985) y otras.

Debido a su alta eficiencia catalítica, las colinesterasas pueden observarse al microscopio por procedimientos de histoquímica clásica (Koelle y Friedenwald, 1949; Karnovsky y Roots, 1964). Sin embargo, las técnicas inmutuocitoquímicas ofrecen más posibilidades, entre las que se incluyen la localización de formas moleculares sin actividad enzimática, la distinción entre subclases de enzima idénticas en cuanto a propiedades catalíticas pero con diferentes regiones antigénicas, etc. Generalmente, los procedimientos inmutuocitoquímicos requieren la incubación del anticuerpo específico, para la proteína que se quiere localizar, con la muestra de tejido fijado; posteriormente, se detecta el anticuerpo primario con un segundo anticuerpo conjugado (por ejemplo, con peroxidasa o fluoresceína). Es necesario disponer de un anticuerpo con alta afinidad, y definir las condiciones de fijación que mantienen al antígeno en una conformación adecuada. A pesar de estos obstáculos, se han empleado diversos anticuerpos con éxito para la localización de la BuChE en cerebro de rata (Barth y Ghandour, 1983), y de la AChE en la unión neuromuscular de varias especies (Fambrough y col., 1982), en el sistema nervioso de rata (Rakonczay y Brimijoin, 1986) y en el órgano eléctrico de *Torpedo* (Eichler y col., 1990).

Los métodos inmunológicos han permitido profundizar en otros muchos aspectos de la bioquímica y de la biología molecular y celular de las colinesterasas. Los anticuerpos también son útiles para investigar el mecanismo de catálisis de las colinesterasas; algunos modifican la actividad catalítica de la molécula de enzima al formar inmunocomplejos con ella (Abe y col., 1983; Brimijoin y Rakonczay, 1986; Wolfe, 1989; Ashani y col., 1991). En este contexto, los anticuerpos también se emplean para estudiar la relación estructura-función, en particular en la molécula de AChE (Ogert y col., 1990; Gentry y col., 1995).

En muchos casos, la orientación de la enzima en la membrana celular se ha determinado con ayuda de anticuerpos (Abramson y col., 1989; Rotundo y col., 1991; Eichler y col., 1992). Por medio del anticuerpo AE-1, se ha demostrado que las formas moleculares más complejas de AChE en microsomas de retículo sarcoplásmico de músculo se encuentran orientadas externamente (Cánovas-Muñoz y col., 1991).

Para investigar la base molecular de la extraordinaria heterogeneidad estructural de las colinesterasas, se recurre al empleo de anticuerpos. Diversos grupos de investigación han obtenido anticuerpos monoclonales que distinguen entre las formas moleculares de AChE de una misma fuente. Por ejemplo, el Prof. Doctor y col. (1983) han generado una serie de anticuerpos monoclonales contra las formas moleculares de la enzima de *Torpedo*. La mayoría de ellos reconoce por igual todas las moléculas de AChE de *Torpedo*; pero el anticuerpo 4F3 sólo forma complejos con las formas asimétricas, mientras que el 4E7 interacciona de manera selectiva con las moléculas G_2^A Tipo I. La especificidad de 4F3 se debe a la localización del epítipo para este anticuerpo en el tallo de naturaleza colagénica (sólo presente en las moléculas asimétricas). Por tanto, la capacidad de interacción de las formas moleculares **A** con 4F3 se pierde cuando dichas formas se tratan con tripsina o colagenasa. El anticuerpo 4E7 reconoce un oligosacárido unido a un resto Asn de la molécula G_2^A (Abramson y col., 1989; Wasserman y col., 1993). El grupo del Prof. Doctor también ha obtenido anticuerpos policlonales contra un péptido sintético, que reproduce la

secuencia de aminoácidos propia de la región C-terminal de la subunidad catalítica T de AChE (Abramson y col., 1989). Debido a este hecho, estos anticuerpos distinguen entre las formas moleculares **A** (constituidas por subunidades T) y las G_2^A (formadas por la unión de dos subunidades H) (**Tabla 1.2** y Apdo. 1.4). Como se comentó en el Apdo. 1.5.3, se ha conseguido conocer la diferente distribución de las formas moleculares de AChE en el órgano eléctrico de *Torpedo* con la ayuda de anticuerpos, que reconocen de manera específica las distintas formas de la enzima (Abramson y col., 1989). Otras investigaciones han destacado la utilidad de los anticuerpos para distinguir entre varias formas moleculares de un mismo tejido. Así, los anticuerpos generados contra la membrana de eritrocito muestran preferencia por la molécula G_2^A frente a los monómeros, lo que ha servido para verificar que los dímeros son las formas nativas de AChE en los eritrocitos (Ott y col., 1983).

También se han empleado anticuerpos para comparar la AChE de diferentes tejidos. Los cinco anticuerpos AE-1-AE-5, generados contra la AChE de eritrocito humano, reconocen tanto la enzima de eritrocito como la de la unión neuromuscular humana, a pesar de interaccionar cada uno con un epítipo distinto (Fambrough y col., 1982). Esta reacción cruzada ha puesto de manifiesto la existencia de una notable homología secuencial entre la enzima de ambas fuentes. Sin embargo, otros anticuerpos distinguen entre la enzima de distintos tejidos. Este es el caso del anticuerpo monoclonal ZR1, que no reconoce la AChE de eritrocito de rata y en cambio forma complejos con las moléculas de AChE de cerebro del mismo animal (Rakonczay y Brimijoin, 1985).

En ocasiones, las diferencias inmunológicas entre las formas moleculares de AChE reflejan cambios en el procesamiento postraducciona, por ejemplo, en la naturaleza de la glicosilación. En el órgano eléctrico de *Torpedo*, la mayoría de las moléculas G_2^A , pero no las formas asimétricas, interaccionan con un anticuerpo monoclonal tipo IgM, generado contra la AChE de *Electrophorus* (Elec-39) (Bon y col., 1987; Musset y col., 1987). El anticuerpo Elec-39 reconoce un carbohidrato y su especificidad es similar a la del HNK-1. Este último anticuerpo y otros relacionados (NC-1, L2) se unen a glicolípidos y

glicoproteínas implicados en la adhesión celular (glicoproteínas asociadas a la mielina, ependiminas, etc.). El glicano que constituye el epítipo de estos anticuerpos contiene restos de glucuronato-sulfato y podría intervenir directamente en los procesos de adhesión celular (Keilhauer y col., 1985). De hecho, se emplea como marcador para identificar moléculas de adhesión (citotactina y otras) (Grumet y col., 1985). La AChE de peces eléctricos (*Electrophorus* y *Torpedo*) ha sido la primera proteína enzimática en la que se ha detectado dicho epítipo. Ésta y otras evidencias sugieren que las colinesterasas podrían participar en los fenómenos de interacción celular (Apdo. I.3.3). A partir de AChE de *Torpedo nacline timilie*, el Dr. Brodbeck y col. han generado otro anticuerpo monoclonal anti-carbohidrato (2G8) (Liao y col., 1991). Este anticuerpo también interacciona con la AChE de *Torpedo marmorata*, *Electrophorus electricus* y con la molécula G₄ de AChE de cerebro de mamífero, pero no con la AChE de eritrocito de mamífero, ni con la BuChE de suero humano. El anticuerpo 2G8 inhibe la actividad de las formas moleculares G₂ de AChE de *Torpedo*, pero no la de las formas A, ni la de la AChE de otras especies. Existe cierta similitud entre la especificidad de los anticuerpos 2G8 y Elec-39, aunque este último nunca inhibe la actividad AChE.

Los anticuerpos también son útiles para investigar las diferencias entre los dos tipos de colinesterasas, AChE y BuChE. En general, los anticuerpos generados contra AChE no presentan reacción cruzada con BuChE y viceversa (Brimijoin y col., 1983; Marsh y col., 1984; Brimijoin y Rakonczay, 1986; Lappin y col., 1987), aunque se conocen algunas excepciones (Doctor y col., 1983; Dreyfus y col., 1988). La elevada homología (53%) en la secuencia de aminoácidos entre la BuChE de suero humano y la AChE de *Torpedo* (Schumacher y col., 1986) sugiere la existencia de un ancestro común para las dos enzimas. Por tanto, la falta de reacción inmunológica cruzada se debería a diferencias en la conformación (en el patrón de plegamiento) o en el procesamiento postraducciona l de ambas enzimas, más que a la carencia de homología a nivel de la estructura primaria. Otra posibilidad es que las regiones

homólogas sean las menos aptas para generar anticuerpos, es decir, presenten baja inmunogenicidad (Dreyfus y col., 1988).

1.2. El anticuerpo AE-1

El anticuerpo monoclonal AE-1 se obtuvo contra la AChE de eritrocito humano (Fambrough y col., 1982). La enzima de eritrocito humano es una molécula dimérica Tipo I, ligada a la membrana a través de un glicolípido (GFI-G₂^A). Tras extraer la AChE de las membranas con Triton X-100 y purificarla por cromatografía de afinidad en una resina de acridinio, se empleó para inmunizar ratones BALB/cJ. Se formaron hibridomas por fusión de las células del bazo del ratón inmunizado con células de la línea de mieloma Sp 2/0, seleccionándose cinco clones productores de anticuerpos contra la AChE (clones AE-1-AE-5). Los cinco anticuerpos procedentes de los distintos clones eran inmunoglobulinas del tipo G₁, que reconocían la AChE de eritrocito humano, una característica verificada por el cambio en la velocidad de sedimentación de la enzima tras la formación de los complejos enzima-anticuerpo.

Por técnicas inmunocitoquímicas se comprobó que los cinco anticuerpos AE también interaccionaban con la AChE de la unión neuromuscular humana (Fambrough y col., 1982). Además, se analizó el grado de conservación de los epítomos para estos anticuerpos por tñido inmunocitoquímico de la unión neuromuscular de diferentes especies (Fambrough y col., 1982). Cada anticuerpo presentaba un patrón de interacción específico con AChE, un dato obtenido por la diferente intensidad con que se tñía la unión neuromuscular de cada especie tras incubarla con el anticuerpo en cuestión. Los anticuerpos AE-1 y AE-2 proporcionaban un patrón de interacción similar, y sus epítomos eran los más conservados, ya que reconocían la AChE neuromuscular del mayor número de especies. No obstante, el nivel de interacción fue distinto según la especie y siempre inferior al que presentaban con la enzima humana. Los resultados probaron la existencia de un epítomo diferente para cada anticuerpo

AE-1-AE-5. Estos anticuerpos han permitido diferenciar la AChE de varias especies, incluso la enzima de especies de mamíferos muy relacionadas. Los cinco sitios antigénicos se conservan en la AChE humana, tanto de glóbulo rojo como de la unión neuromuscular, demostrando el alto grado de similitud secuencial y estructural entre la enzima de ambos tejidos.

En realidad, el Dr. Fambrough y col. (1982) no llegaron a demostrar si los anticuerpos AE-1-AE-5 interaccionaban con todas las formas moleculares de AChE de la unión neuromuscular humana o de otras especies. El teñido inmunocitoquímico de secciones de músculo mostró que los sitios antigénicos quedaban distribuidos por la hendidura sináptica y en los pliegues secundarios de la unión neuromuscular, distribución que coincidía con la de las moléculas asimétricas de AChE ancladas a la lámina basal a través del tallo colagénico. Además, el grupo del Dr. Fambrough comprobó que los anticuerpos AE-1 y AE-3 aumentaban la velocidad de sedimentación de las formas enzimáticas asimétricas de 16S. Estos resultados probaron que AE-1 y AE-3 reconocían la molécula A_{12} de la unión neuromuscular. Sin embargo, no aportaban una prueba directa a favor de la interacción de estos anticuerpos con las formas globulares de AChE, principalmente moléculas G_4 y G_2 anfífilicas, que, aunque localizadas en la unión neuromuscular, están asociadas a la membrana celular (Apdo. I.5.3).

Trabajos posteriores de otros grupos de investigación han profundizado en la capacidad del anticuerpo AE-1 para interaccionar con las moléculas globulares de AChE de diversas fuentes. Así, se ha demostrado que dicho anticuerpo se une a las formas moleculares G_4^S del líquido amniótico (Rasmussen y col., 1987) y cefalorraquídeo (Tornel y col., 1993) humanos. El grupo del Dr. Vidal ha empleado el anticuerpo AE-1 para investigar posibles diferencias entre las distintas formas moleculares de AChE de músculo. En particular, y puesto que se sabía que el anticuerpo AE-1 se une a la AChE (al menos a las moléculas **A**) de la unión neuromuscular de conejo (Fambrough y col., 1982), se probó la interacción del anticuerpo con los componentes moleculares de AChE de los microsomas de músculo esquelético de conejo.

Los microsomas, aislados del músculo según el procedimiento descrito por la Dra. Cánovas-Muñoz y col. (1990), estaban enriquecidos en membranas del retículo sarcoplásmico; tras la incubación con Triton X-100 se liberaba un 50-60% de la AChE unida a las membranas. La enzima extraída con Triton X-100 se dejaba interaccionar con el anticuerpo AE-1 inmovilizado sobre agarosa-proteína A (Apdo. IV. 2.7). Después de precipitar las bolitas de agarosa por centrifugación, se identificaron por análisis de sedimentación las formas moleculares de AChE no ligadas al anticuerpo. Como se observa en la **Figura IV.1a**, las moléculas más complejas de AChE (formas A_{12} y G_4) se unían al anticuerpo, y por tanto, desaparecían en los gradientes tras incubar con AE-1 fijado a la agarosa. Por el contrario, las moléculas G_1 no interaccionaban con el anticuerpo AE-1 (Campoy, 1992).

El Dr. Vidal y col. también investigaron la posible interacción del anticuerpo AE-1 con las formas moleculares de AChE de otras fuentes, concretamente de cerebro humano. El 70-80% de la AChE del cerebro se extraía con Tritón X-100 al 1% en tampón Tris salino (Sáez-Valero y col., 1993). El perfil de sedimentación de las moléculas de AChE extraídas con el detergente mostraba dos formas enzimáticas mayoritarias, G_4 y G_1 , y un hombro minoritario de moléculas G_2 . No obstante, el pico de G_4 se desdoblaba claramente en dos componentes en gradientes con Brij 96: uno correspondiente a las moléculas G_4^H débilmente unidas a las membranas, y otro componente principal G_4^A , que migra más lentamente en el gradiente (**Fig. IV.1b**). En los análisis de sedimentación de la muestra de cerebro previamente incubada con agarosa-proteína A-AE-1, sólo se identificaba el pico perteneciente a los monómeros, indicando la ausencia de interacción entre estas formas moleculares y el anticuerpo. El AE-1 sí reconocía la práctica totalidad de las moléculas G_4 , tanto anfifílicas como hidrofílicas, y a las G_2 (**Fig. IV.1b**).

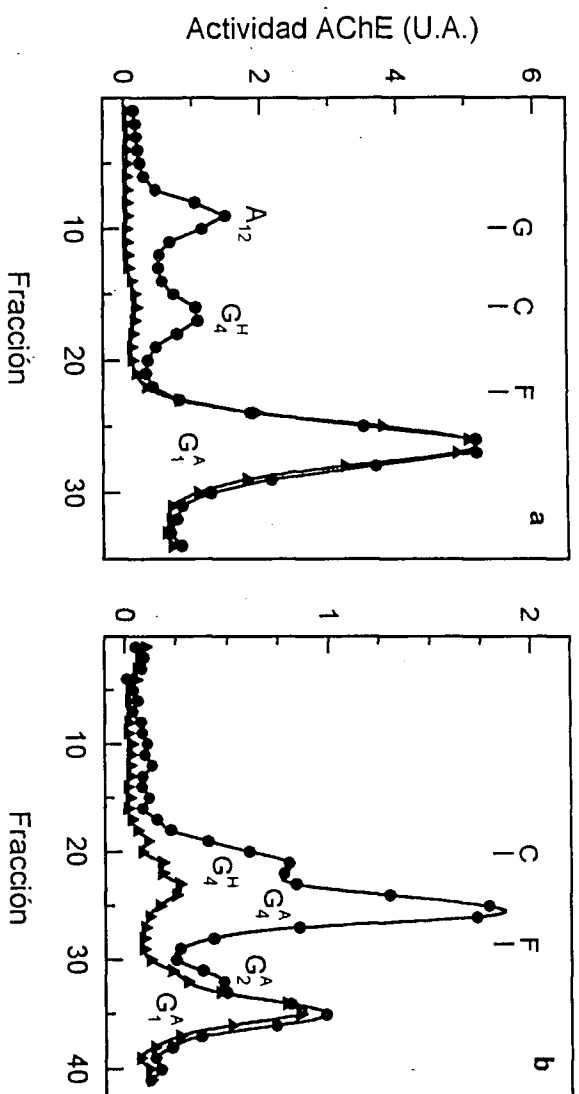


Figura IV.1. Interacción entre el anticuerpo AE-1 y las formas moleculares de AChE procedentes de microsomas de músculo esquelético de conejo (a) o extraídas de cerebro humano (b). La enzima se solubilizó con Triton X-100 en tampón Tris salino. Antes del análisis de sedimentación, la AChE solubilizada se incubó 12 h, a 4°C, con agarosa-proteína A sin (●) o con (▲) el AE-1 ligado. La enzima unida a la resina se separó por centrifugación, y la enzima libre se analizó en gradientes de sacarosa del 5-20% en tampón Tris salino con Triton X-100 (a) o Brij 96 (b) al 0,5% (p/v). Los gradientes se centrifugaron a 165.000 g_{max} por 18 h, a 4°C. Se recogieron fracciones y se midió la actividad AChE (expresada en unidades arbitrarias, U.A.) en un medio con DTNB 0,3 mM, ATCh 1 mM e iso-OMPA 50 μ M (Apdo. II.2.3.3). Las enzimas marcadoras fueron: β -galactosidasa (16,0S, G), catalasa (11,4S, C) y fosfatasa alcalina (6,1S, F). Se observa que las moléculas G_1 no interaccionaron con el anticuerpo AE-1. El carácter hidrofílico o anfifílico de las formas moleculares de AChE se ha asignado según las observaciones previas de la Dra. Cánovas-Muñoz y col. (1990) y el Dr. Sáez-Valero y col. (1993).

A partir de estos resultados, nos propusimos determinar la base molecular de las diferencias inmunológicas encontradas entre las formas G₁, que al parecer carecen del epítipo reconocido por AE-1, y el resto de los componentes moleculares de AChE de músculo y cerebro. Además, este estudio nos permitiría profundizar en la naturaleza y localización, hasta la fecha poco conocidas, del epítipo para el anticuerpo AE-1. Tal y como se ha comentado en este Apartado, AE-1 y AE-2 presentan parecida reactividad frente a la AChE de diversas fuentes, sin embargo, se unen a diferentes puntos sobre la molécula de enzima. Así, la AChE de eritrocito humano, tras formar complejos con uno de estos anticuerpos, todavía podía ligar el otro anticuerpo y aumentar aún más su velocidad de sedimentación en gradiente. Este experimento confirmó que el epítipo para ambos anticuerpos era distinto (Fambrough y col., 1982). Dichos resultados fueron confirmados por el Prof. Olson y col. (1990).

La interacción del AE-2 con la AChE ha merecido especial atención por el efecto inhidor del anticuerpo. El AE-2 inhibe hasta un 80% la actividad AChE de eritrocito y cerebro humanos (Sorensen y col., 1987), y de SFB (Doctor y col., 1989; Wolfe, 1989), sin que se logre incrementar el grado de inhibición al aumentar la concentración de anticuerpo. Se trata de una inhibición reversible no competitiva, con una estequiometría de 3,8 moléculas de AE-2 por subunidad de enzima (Sorensen y col., 1987). Debido a la acción inhibidora, se ha estudiado con más detalle la naturaleza del epítipo para AE-2 que la del epítipo para AE-1, por cuanto podría proporcionar información sobre la estructura del centro activo de la AChE. En ensayos de "dot-blot", la enzima de eritrocito humano, desnaturalizada o no con SDS, se ligó a nitrocelulosa para examinar su capacidad de interacción con el anticuerpo AE-2. Se comprobó que el anticuerpo reconocía la enzima en el estado nativo, pero no en el desnaturalizado. Ello indicaba que el epítipo para AE-2 era de naturaleza conformacional, no secuencial; es decir, el epítipo probablemente consiste en un dominio propio de la conformación nativa de la enzima, y no en una secuencia específica de aminoácidos (Sorensen y col., 1987). Otros ensayos

con péptidos -obtenidos tras desnaturalizar y tratar con bromuro de cianógeno la AChE de SFB- revelaron que el epítipo para AE-2 se hallaba entre los aminoácidos 53 y 84 del extremo amino terminal de la enzima (Doctor y col., 1989). Así, péptidos sintéticos con la secuencia aminoacídica del fragmento 53-84 de la AChE de SFB competían con la enzima por la unión al anticuerpo AE-2. Según el Dr. Wolfe (1989), estos resultados no contradicen necesariamente los experimentos de "dot-blot" del Prof. Sorensen y col., ya que la sensibilidad de los diferentes ensayos es distinta.

El fragmento polipeptídico 53-84 de la AChE de SFB está alejado secuencialmente de la serina 200 (S200) del centro activo de la enzima (Apdo. I.1.3). Además, el AE-2 no interfiere con la fosforilación de la AChE por DFP (un organofosforado que se une a la S200), ni el marcaje con DFP impide la formación de los complejos enzima-anticuerpo (Sorensen y col., 1987; Doctor y col., 1989; Olson y col., 1990). Por tanto, puede descartarse que el epítipo para AE-2 esté próximo al subcentro esterásico en la estructura tridimensional de la AChE. Por el contrario, ligandos específicos del subsitio aniónico del centro activo, como el edrofonio y el BW284C51, disminuyen la velocidad de formación de los complejos AChE-AE-2 (Sorensen y col., 1987). Dado que el anticuerpo AE-2 es un inhibidor de tipo no competitivo, que no modifica la K_m ni la constante de inhibición por exceso de sustrato (K_{ss}) para la ACh, parece probable que la unión del AE-2 a la molécula de AChE ocurra lejos del subsitio aniónico del centro activo e induzca una acción alostérica a larga distancia (Sorensen y col., 1987). Según los experimentos del Dr. Olson y col. (1990), el edrofonio y el BW28C51 no modifican la interacción del anticuerpo AE-2 con la AChE; no obstante, estos investigadores obtuvieron conclusiones parecidas a las del grupo del Prof. Sorensen, sugiriendo la presencia de un nuevo sitio alostérico en la molécula de enzima, al cual se ligaría el anticuerpo AE-2 modificando el proceso catalítico.

2. MÉTODOS

2.1. Materiales

En los experimentos de inmunoprecipitación con resina de agarosa (Apdo. IV.2.7) se empleó el anticuerpo AE-1 purificado, que se obtuvo por gentileza del Dr. Fambrough (Johns Hopkins University, Baltimore, MD, Estados Unidos). El AE-1 utilizado en los demás inmunoensayos procedía de Chemicon International Inc. (número de catálogo, MAB304), que lo suministró como líquido ascítico.

La AChE de SFB se purificó como se describe en el Apartado II.2.2. La enzima purificada de eritrocito humano se obtuvo gracias a la generosidad del Dr. Brodbeck de la Universidad de Berna.

La pepstatina (nº cat., P-4265), ácido iodoacético, membrana de PVDF (nº cat., P-2438) y nitrocelulosa (N-8392), papel de filtro especial para "blotting" (P-4546), marcadores preteñidos para "Western Blot", negro de Amido, CHAPS y diaminobenzidina procedían de Sigma. La misma casa comercial proporcionó los diferentes anticuerpos de cabra generados contra las IgG de ratón: simples (nº cat., M-4280), marcados con peroxidasa (A-2554) o conjugados con una resina de agarosa (A-3665). La tinta china se consiguió de Pelikan, y los papeles especiales de filtro para los experimentos de "Slot-Blot" de Bio-Rad (nº cat., 1620161).

2.2. Extracción de la AChE de eritrocito humano

Para la obtención de la AChE de eritrocito humano (EH), nos basamos en el protocolo descrito por el Dr. Olson y col. (1990). Como material de partida, se utiliza sangre humana recién extraída, a la que se añade citrato sódico como anticoagulante. La concentración óptima del citrato sódico es 9,5 mg por 2,25 ml de sangre.

Los eritrocitos se precipitan suspendiendo un volumen de sangre (por ejemplo, 2,5 ml) en tres (7,5 ml) de una disolución fría de NaCl 0,15 M en fosfato 5 mM, pH 7,5, y centrifugando 10 min a 100 g_{max} . El precipitado de eritrocitos se resuspende en 7,5 ml del mismo tampón fosfato salino y se vuelve a centrifugar como antes. El procedimiento de lavado de los eritrocitos se repite una vez más. En estos pasos de lavado, aunque se arrastren algunas células, es importante eliminar el sobrenadante en contacto directo con los eritrocitos precipitados, ya que éste contiene los leucocitos (con abundantes proteasas que podrían comprometer el proceso de extracción de la AChE) y las plaquetas. Después de la última centrifugación, el precipitado se resuspende, con agitación vigorosa, en 50 ml (20 veces el volumen inicial de sangre) de una disolución fría de tampón fosfato 5 mM, pH 7,5, para lisar los eritrocitos. Tras centrifugar 30 min a 100.000 g_{max} y a 4°C, se obtiene el precipitado de membranas rotas de eritrocito, que se resuspende nuevamente en 50 ml del tampón fosfato, para lavar mejor las membranas. Se centrifuga a 100.000 g_{max} en las condiciones anteriores, y tras eliminar el sobrenadante, se añaden al precipitado 2,5 ml (volumen inicial de sangre) de NaCl 1 M, MgCl₂ 50 mM, Triton X-100 al 1% (p/v), en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,0, conteniendo como antiproteasas EGTA 5 mM, EDTA 3 mM y pepstatina 5 µg/ml. La mezcla se incuba con agitación 12 h a 4°C. Después, se centrifuga a 100.000 g_{max} , 1 h a 4°C, y se toma el sobrenadante que contiene la enzima solubilizada con Tritón X-100. En el sobrenadante se valora la actividad AChE (Apdo. II.2.3.2).

2.3. Tratamiento reductor y alquilante con β -mercaptoetanol y iodoacetato

Según el protocolo descrito por el Dr. Ott y col. (1983), se utiliza β -mercaptoetanol (β -ME) y iodoacetato (IA) como agente reductor y alquilante, respectivamente, para generar formas moleculares G_1 a partir de la molécula dimérica de AChE de EH. En estos experimentos se emplea AChE purificada de EH con una actividad específica de 5060 U/mg (μ moles de ATCh hidrolizados por min/mg de proteína), gentilmente suministrada por el Dr. Brodbeck (Brodbeck y col., 1981) de la Universidad de Berna.

Previo al tratamiento, la AChE purificada de EH se diluye 100 veces en Triton X-100 al 0,1% (p/v), EDTA 4 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,5, para obtener una actividad específica final de 51 U/mg. La muestra diluida se incuba 40 min a temperatura ambiente con β -ME 14 mM, que es la concentración final en la muestra tras añadir el volumen preciso del reactivo comercial. Mientras tanto, se prepara una disolución de IA 2,5 M en Triton X-100 al 0,1%, EDTA 4 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,5. Después de diluir el IA en el tampón, es necesario ajustar de nuevo el pH a 8,5 con NaOH 1 M. Tras la incubación con β -ME, se deposita en la muestra el volumen exacto de IA 2,5 M, para alcanzar una concentración final de 0,14 M del agente alquilante. La AChE se incuba con IA 0,14 M durante 40 min, a temperatura ambiente y en oscuridad. Para eliminar los reactivos del tratamiento anterior, la muestra se pasa por una columna de "desalting" equilibrada con Triton X-100 al 0,5%, en tampón fosfato 50 mM, pH 8. Por último, se separan las formas moleculares de AChE, generadas por reducción, mediante centrifugación en gradientes de sacarosa.

2.4. Electrotransferencia y "blotting" de las proteínas

2.4.1. Electrotransferencia

Los experimentos de "Western Blot" se realizan inmediatamente después de la electroforesis desnaturalizante (Apdo. II.2.5). Tras la electroforesis, se

retira el gel espaciador, y el gel separador se sumerge durante 15 min en metanol al 20%, glicina 39 mM, Tris-HCl 48 mM, pH > 8,3 (tampón T o de transferencia); (el pH del tampón T no se ajusta con HCl ni con otro ácido, ya que, al disolverse por completo la glicina y el Tris, alcanza un valor apropiado, próximo a 8,7; además, no es conveniente añadir cloruros al medio de transferencia). También se bañan en el tampón T dos papeles de filtro especiales para "blotting" (blotting paper; Sigma), recortados según las dimensiones aproximadas del gel. Para la transferencia, se emplea una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF; Sigma) de 9x6 cm y 0,45 μ m de diámetro de poro. Nunca debe tocarse la membrana sin guantes, y hay que mantenerla húmeda durante todo el proceso. Por ello, se sumerge la membrana de PVDF sucesivamente en metanol, agua y tampón T, durante 5 s, 2 y 10 min, respectivamente. El SDS interfiere con la unión de las proteínas a las membranas de PVDF, por tanto, sólo cuando se transfieren proteínas muy hidrofóbicas, se añade SDS al 0,01% (p/v) al tampón de transferencia y, en ese caso, es aconsejable utilizar membranas de nitrocelulosa. Por otra parte, el metanol se añade al tampón T para facilitar la transferencia de las proteínas de pequeño tamaño (alrededor de 80 kDa, como en nuestro caso, o menores).

El "sandwich" se monta entre dos esponjas diseñadas para este propósito, y según el siguiente orden: papel de filtro, membrana de PVDF, gel, papel de filtro, de forma que el gel no sobresalga de la membrana. Durante todo el proceso de montaje, el "sandwich" se mantiene sumergido en tampón T, para evitar que se seque la membrana de PVDF. También hay que evitar que queden atrapadas burbujas de aire. El "sandwich" se coloca en el "porta-sandwich", y éste, a su vez, en la cubeta del sistema de electrotransferencia (Mini Trans-blot, Bio-Rad), comprobando que la membrana de PVDF quede situada entre el borne positivo y el gel, ya que, una vez conectada la corriente eléctrica, las proteínas se desplazarán hacia el ánodo. La cubeta se llena con tampón T y, las proteínas se transfieren del gel a la membrana aplicando un voltaje constante (100 V), durante 1 h, a 4°C.

Finalizada la electrotransferencia, se desmonta el “sandwich” y se marca la posición del gel sobre la membrana de PVDF antes de separar las dos capas. En un primer momento, el empleo de marcadores preteñidos permite comprobar si la transferencia ha sido correcta; después, la primera impresión se confirma tiñendo el gel con azul de Coomassie (Apdo. I.2.5.4) y la porción de la membrana de PVDF, que contiene la calle de los marcadores no preteñidos, con negro de Amido (tinción irreversible de proteínas). La tinción comercial de negro de Amido (Sigma) es una disolución al 0,2% (p/v) en 50% (v/v) de isopropanol y 20% (v/v) de ácido acético. La porción de la membrana de PVDF se sumerge por 1 min en una mezcla a partes iguales de la tinción comercial y agua desionizada. La disolución de negro de Amido detecta cantidades de proteína próximas al microgramo. Por último, el exceso de colorante en la membrana se elimina con una disolución de desteñido (etanol 10% v/v, ácido acético 10% v/v).

La porción de la membrana de PVDF sin los marcadores se divide en dos partes idénticas, cada una de las cuales contiene la misma cantidad de proteína problema (la subunidad desnaturalizada de la AChE de EH o de SFB). Durante el inmunoensayo (Apdo. IV.2.4.2), una de las partes idénticas servirá como membrana “prueba” y la otra como “control”.

2.4.2. Análisis de la interacción de la AChE fijada a membranas de PVDF con el anticuerpo AE-1

Durante todo el protocolo las membranas se mantienen en agitación suave. Inmediatamente después de la electrotransferencia, las membranas “prueba” y “control” se lavan con 0,15 M de NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 (tampón A). Posteriormente, se bloquean con albúmina de suero bovino (BSA) al 3% (p/v) en tampón A, durante 12 h, a 4°C. Tras lavar con tampón B (Tween-20 al 0,1% p/v en tampón A), la membrana “prueba” se incuba 6 h, a 25°C, con el anticuerpo AE-1 (Chemicon Int.) diluido 1:1000 en tampón A con BSA al 1%, Tween-20 al 0,05%, mientras que la membrana “control” se incuba en las mismas condiciones y con el mismo tampón, pero sin el anticuerpo AE-1.

Después de lavar las dos membranas varias veces con tampón B, se incuban 2 h, a 25°C, con un anticuerpo marcado con peroxidasa que reconoce la porción F_c de las inmunoglobulinas G de ratón (Sigma); previamente, el anticuerpo conjugado con peroxidasa se diluye 2000 veces en tampón B. Las incubaciones de las membranas con los anticuerpos transcurren en el interior de bolsitas de plástico perfectamente selladas, de manera que, al emplear volúmenes pequeños, se gasta poco anticuerpo. Después de la incubación con el anticuerpo anti-ratón, las membranas se lavan varias veces con el tampón B y por último con el tampón A.

La marca de actividad peroxidasa sobre las membranas de PVDF indica la formación de los complejos entre la AChE y el anticuerpo AE-1. Para revelar la actividad peroxidasa, se emplea una disolución de diaminobenzidina y sulfato de níquel al 0,06% y 0,03%, respectivamente, en tampón A. Después, se mezclan 30 μ l de H_2O_2 , al 30%, con 30 ml de la disolución de revelado (previamente filtrada). La mezcla se vierte sobre las membranas, agitando lentamente hasta que aparezca un precipitado marrón oscuro de suficiente intensidad en las zonas con actividad peroxidasa. Primero se tiñe la membrana "prueba", y luego la "control" durante el mismo tiempo. La ausencia de tinción en la membrana "control" demuestra que el anticuerpo conjugado con la peroxidasa no se une inespecíficamente a la AChE. Por último, las membranas "control" y "prueba", si no han revelado actividad peroxidasa, se tiñen con negro de Amido o tinta china diluida 1:1000 en tampón A, para comprobar que las proteínas se transfirieron correctamente a las membranas. La tinta china es otra tinción irreversible (tan apropiada o más que el negro de Amido), que se emplea para detectar las proteínas en membranas de PVDF o nitrocelulosa.

En los experimentos de "Western Blot", la masa molecular de las proteínas problema se determina a partir de la distancia recorrida por los estándares, los cuales se tiñen con negro de Amido (marcadores no preteñidos; Apdo. IV.2.4.1). La mezcla de proteínas patrones es la utilizada para la SDS-PAGE (Apdo. II.2.5.2). El cálculo de la masa molecular respecto a estos marcadores resulta más exacto que si se hiciera respecto a los preteñidos.

2.5. Adsorción de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa aplicando vacío. Experimentos de "Slot-Blot".

Para la fijación de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa, se emplea un sistema (Bio-Dot SF Microfiltration Apparatus, Bio-Rad) conectado a una bomba de vacío. El aparato está diseñado para que la membrana sirva como base de 48 pocillos de unos 500 μ l de capacidad cada uno. Cada pocillo delimita sobre la membrana de nitrocelulosa una superficie de 7x0,75 mm ("Slot-Blot"). La nitrocelulosa tiene capacidad para unir alrededor de 1 μ g de proteína por mm^2 ; por tanto, una superficie de 7x0,75 mm podrá ligar unos 5 μ g. El conducto, que se acopla a la bomba de vacío, está situado por debajo del nivel de la base de los pocillos, para facilitar el drenaje del líquido depositado en ellos. Dicho conducto posee una válvula con tres posiciones, que permite regular el vacío una vez que la bomba está funcionando.

Para los experimentos de "Slot-Blot", se utiliza una membrana de nitrocelulosa de 9x12 cm y 0,45 μ m de tamaño de poro (Sigma). La membrana siempre se manipula con guantes. Antes de colocarla en el aparato de filtración, se humedece, junto con tres papeles especiales de filtro (Bio-Dot SF filter paper, Bio-Rad), en una disolución de NaCl 0,15 M, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 (tampón A). Una vez colocada en el aparato de filtración, la membrana debe quedar perfectamente aprisionada entre el molde de los pocillos y la capa formada con los tres papeles de filtro, evitando dejar atrapadas burbujas de aire. De esta manera, la muestra depositada en un pocillo no escapará hacia los adyacentes. Antes de depositar las muestras, la membrana se rehidrata añadiendo 100 μ l de tampón A a todos los pocillos, y aplicando vacío suave para que drene el tampón. Cuando los pocillos se vacían, se desconecta la bomba de vacío y, en ese momento, el sistema está listo para agregar las muestras. Hay que evitar que la membrana de nitrocelulosa se seque, bien porque se aplique vacío sin líquido en los pocillos, bien porque transcurra mucho tiempo antes de depositar las muestras.

Los extractos aplicados sobre las membranas de nitrocelulosa contienen las formas moleculares de AChE de SFB obtenidas tras el tratamiento reductor y alquilante (Apdo. III.2.3), y separadas por centrifugación en gradientes de densidad (Apdo. II.2.7). Debido a que muchos detergentes, caso del Triton X-100, interfieren con la unión de las proteínas al soporte de nitrocelulosa, los gradientes se preparan con 0,1% de CHAPS, que es un detergente dializable. Además, no se ponen enzimas marcadoras en los gradientes, porque cosedimentarían con la forma molecular de AChE de similar coeficiente de sedimentación, y competirían con ésta para unirse a la membrana. Por tanto, los coeficientes de sedimentación de las proteínas problema se asignan comparando los perfiles de sedimentación con otros obtenidos para la misma muestra, en los que sí se han añadido los marcadores. Una vez aisladas las formas individuales de AChE de los gradientes, las preparaciones se dializan frente a 0,002% (p/v) de CHAPS, 0,5 M de NaCl, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 (tampón de diálisis), durante 24 h, a 4°C. A continuación, se depositan en cada pocillo del aparato de filtración entre 250-500 µl de la muestra dializada, evitando la formación de burbujas de aire. En otros pocillos se ponen volúmenes iguales de las muestras diluidas con tampón de diálisis. Finalmente, los pocillos sin muestra se llenan con 250-500 µl de tampón A. Se aplica vacío suave y, conforme drene todo el líquido de los pocillos, éstos se rellenan con 200 µl de tampón A, para lavar la membrana de nitrocelulosa. Inmediatamente después del lavado, se desmonta el aparato de filtración y se separa la membrana.

La interacción entre las formas moleculares de AChE adsorbidas a la membrana de nitrocelulosa y el anticuerpo AE-1 se analiza mediante el inmunoensayo descrito en el Apartado IV.2.4.2. En el experimento de "Slot-Blot", las muestras se depositan por duplicado sobre la membrana, de forma que una porción de la misma sirva de "prueba" y otra de "control" del inmunoensayo. Tras éste, las membranas "control" y "prueba", si no han revelado actividad peroxidasa, se incuban con tinta china.

2.6. Fijación del anticuerpo AE-1 a pocillos de poliestireno

La interacción entre el anticuerpo AE-1 y las distintas formas moleculares de AChE con actividad enzimática (nativas o reducidas y alquiladas) se investiga mediante un inmunoensayo, en el cual, a diferencia de lo que ocurre en los experimentos de "Western" o "Slot-Blot" descritos en la presente Memoria, es el anticuerpo el que se fija a la fase sólida. Para los ensayos se emplean placas de poliestireno de fondo plano (Immuno Plate MaxiSorp, Nunc) con pocillos preactivados de unos 400 µl de capacidad. El trazador enzimático, utilizado para detectar la formación del complejo antígeno-anticuerpo, es el propio antígeno (la AChE).

En cada pocillo se depositan 100 µl de una disolución (10 µg/ml) de IgG de cabra (Sigma), generada contra la porción F_C de la IgG de ratón, en 50 mM de bicarbonato, pH 9,6. Después de incubar las placas 12 h, a 4°C, con agitación suave (circunstancia que se mantiene en todos los periodos de incubación del ensayo), se lavan los pocillos cuatro veces con 200 µl de una disolución que contiene 0,15 M de NaCl, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 (tampón A). Tras retirar por última vez el tampón de lavado, se añaden a los pocillos 200 µl de albúmina de suero bovino (BSA) al 2% (p/v) en tampón A. Las placas se incuban 3 h, a temperatura ambiente, para bloquear con la albúmina la superficie libre de anticuerpo de cabra. A continuación, los pocillos se lavan tres veces con 200 µl de Tween 20 al 0,1% (p/v), 0,15 M de NaCl en Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 (tampón B). Después del último lavado, se depositan en los pocillos 100 µl del anticuerpo AE-1 (Chemicon Int.) diluido 4000 veces en el tampón A con 0,05% (p/v) de Tween 20 y 1% (p/v) de BSA. La incubación con el anticuerpo AE-1 se prolonga por 40 h, a 4°C. Los pocillos se lavan con el tampón B como antes, para eliminar las moléculas del anticuerpo AE-1 no unidas a la inmunoglobulina anti-ratón. Finalizado el lavado, las placas quedan preparadas para añadir las preparaciones de AChE.

Las muestras utilizadas contienen las formas moleculares de AChE, de SFB o EH, que permanecen activas tras el tratamiento reductor y alquilante de

las moléculas nativas de enzima (Apdo. III.2.3 y Apdo. IV.2.3), y que se habían aislado previamente por análisis de sedimentación (Apdo. II.2.7). La muestra, conteniendo los componentes individuales de AChE, se diluye de forma seriada (10 diluciones decrecientes con un factor de dilución de 1,25) con tampón B, para conseguir valores actividad de: 1, 0,8, 0,64,..., 0,14 U/ml (cada unidad de actividad (U) representa un μmol de ATCh hidrolizado por h). Se depositan (por duplicado) 100 μl de cada muestra diluida en un pocillo de la placa con el anticuerpo AE-1 fijado. De esta manera, cada pocillo contiene 100, 80, 64,...o 14 mU de actividad AChE. Las placas con las muestras se incuban 12 h, a 4°C. Tras la incubación, las proteínas no reconocidas por el anticuerpo AE-1 se eliminan lavando las placas 3 veces con 200 μl /pocillo de tampón B. La actividad AChE, que permanece unida al anticuerpo, se valora en un medio con DTNB 0,3 mM y ATCh 1 mM, según el procedimiento en placa de microvaloración descrito en el Apdo. II.2.3.3.

En los ensayos se incluyen siempre unos pocillos "blanco". En un caso, el pocillo "blanco" sólo contienen DTNB y ATCh, para restar el aumento de absorbancia por la hidrólisis espontánea del sustrato. Los otros "blancos" se preparan sin el anticuerpo primero (IgG de cabra) o segundo (AE-1), de forma que se valora la unión inespecífica de AChE al pocillo de poliestireno.

2.7. Inmunoprecipitación con resina de agarosa

Este procedimiento se basa en la capacidad de retirar los inmunocomplejos entre el antígeno (la AChE) y un anticuerpo ligado a un soporte sólido. Después, se valora en el sobrenadante la actividad enzimática no ligada al anticuerpo. Para ello, se incuba la muestra de AChE con el anticuerpo AE-1 unido a una resina de agarosa. Finalizada la incubación, se separa por centrifugación la enzima libre de la ligada a la resina a través del anticuerpo. Por último, se calcula el porcentaje de enzima que ha interaccionado con el anticuerpo, por referencia a un tubo "control" en el que la muestra se incubó con la resina sin el anticuerpo anti-AChE ligado.

La resina empleada es una agarosa conjugada con una IgG de cabra (Sigma), generada contra la cadena pesada de las inmunoglobulinas G₁ de ratón. Su capacidad de unión supera los 0,4 mg de IgG₁ de ratón por ml de gel. En primer lugar, la resina de agarosa-anticuerpo de cabra (100 µl) se diluye con 900 µl de NaCl 0,15 M en fosfato 10 mM, pH 7,2 (tampón fosfato salino, PBS), que contiene albúmina de suero bovino (BSA) al 2% (p/v), incubándose la mezcla 4 h, a 4°C. La finalidad de este tratamiento es saturar con albúmina la resina, para evitar que las proteínas de la muestra se ligen al gel de modo inespecífico. A continuación, el anticuerpo AE-1 purificado (2,2 mg/ml) se diluye en la resina mantenida en PBS-BSA, hasta obtener una concentración final de 22 µg AE-1/ml (ensayos "prueba"). Los tubos, en los que el anticuerpo AE-1 no se añade a la resina, servirán de ensayos "control". Tras incubar con agitación, durante 4 h, a 4°C, las moléculas de AE-1 no unidas a la resina se eliminan con tres ciclos de lavado (dilución del gel con PBS, centrifugación y retirada del sobrenadante).

Una vez que el anticuerpo anti-AChE se ha fijado al gel de agarosa a través de la IgG de cabra, se vierte sobre la resina una muestra de AChE nativa purificada de SFB. Para ello, se depositan 0,5 ml de la muestra diluida en PBS sobre las bolitas de agarosa (la actividad AChE final en la mezcla es de 2 µmoles de ATCh hidrolizados por min y ml). Después, la mezcla se incuba 16 h, a 4°C, con agitación, para que las moléculas de AChE se fijen al anticuerpo inmovilizado. Para separar la enzima no ligada, los tubos se centrifugan (5 min en microfuga de mesa) y se toma el sobrenadante. Los sobrenadantes "prueba" contienen la enzima libre que no ha interaccionado con el anticuerpo anti-AChE. Los sobrenadantes "control", incubados con el gel sin el anticuerpo AE-1 unido, sirven para calcular la actividad AChE en la muestra, tras las 16 h de incubación. Para calcular el porcentaje de enzima reconocida por el anticuerpo AE-1, se valora la actividad AChE en los sobrenadantes "prueba" y "control".

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Naturaleza del epítipo reconocido por el anticuerpo AE-1

Nuestro primer objetivo fue investigar la naturaleza del epítipo para el anticuerpo AE-1. Como paso previo, se analizó la interacción entre el anticuerpo y la AChE nativa de EH y SFB.

El anticuerpo monoclonal AE-1 está generado contra la molécula dimérica ($GFI-G_2^A$) de AChE de EH (Apdo. IV.1.2). La interacción entre el anticuerpo AE-1 purificado (2,2 mg/ml) y la AChE de EH se verificó calculando la velocidad de sedimentación de la enzima antes y después de la incubación con el anticuerpo, ya que los complejos AChE-anticuerpo presentan un mayor coeficiente de sedimentación que la enzima libre. Para ello, la AChE se aisló de las membranas de eritrocito, según el protocolo descrito en el Apartado IV.2.2, y se incubó durante 2 h, a 4°C, con o sin el anticuerpo AE-1 a concentración de saturación (6 μ g AE-1/U AChE; 1 U = 1 μ mol de ATCh hidrolizado por h y ml). La incubación transcurrió en el propio tampón Tris salino empleado para solubilizar la enzima de las membranas (tampón con Tritón X-100 al 1%). El análisis de sedimentación de la AChE de EH incubada en presencia del anticuerpo AE-1 reveló un único pico de actividad AChE de 6,9S en gradientes con Brij 96, que, comparado con el coeficiente de 4,2S calculado para la enzima libre (incubada sin el anticuerpo), demostraba la formación de inmunocomplejos entre la forma molecular $GFI-G_2^A$ de AChE y el AE-1 (**Fig. IV.2**). El desplazamiento observado en el coeficiente de sedimentación (de 4,2S a 6,9S) sugiere que cada molécula dimérica de enzima liga una sola molécula de anticuerpo. Esto no implica necesariamente que haya un único determinante antigénico; por el contrario, es muy probable que cada subunidad enzimática posea el epítipo reconocido por AE-1. La estequiometría 1:2 (una molécula de AE-1 por cada dos subunidades de AChE) se puede explicar suponiendo que la primera molécula de AE-1 dificulte la incorporación de la segunda, cosa que al

parecer ocurre con otros anticuerpos generados contra la enzima de EH (Brimijoin y Mintz, 1985).

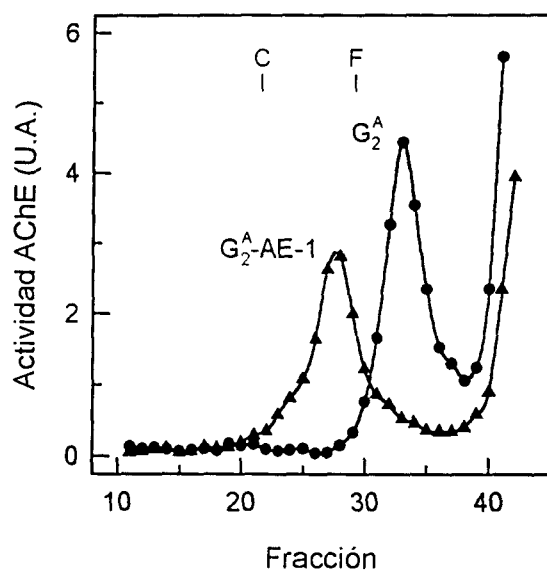


Figura IV.2. Efecto del anticuerpo AE-1 sobre la velocidad de sedimentación de la molécula GFI-G₂^A de AChE de EH. Tras extraerla de las membranas de EH con Triton X-100, la enzima se incubó durante 2 h, a 4°C, sin (●) o con (▲) AE-1. Cada muestra se depositó sobre un gradiente de densidad con Brij 96 al 0,5% (p/v), y se centrifugó como en la Figura IV.1. La actividad AChE también se valoró como en la Figura IV.1. En esta ocasión, los marcadores fueron: catalasa (C) y fosfatasa alcalina (P). Obsérvese el cambio en la velocidad de sedimentación de las moléculas de AChE debido a la formación de inmunocomplejos.

Como se aprecia en la **Figura IV.2**, una cierta cantidad de la actividad enzimática permaneció en la parte alta de los gradientes. Esta característica es propia de los dímeros y monómeros de AChE fuertemente anfílicos, que se extraen, por ejemplo, de meningiomas (Sáez-Valero y Vidal, 1995). Puesto que esta AChE “flotante” no se observó en los perfiles de sedimentación de la

enzima purificada de EH, dicha actividad podría corresponder a la AChE atrapada en micelas de lípidos y Triton X-100 durante el proceso de extracción. La AChE "flotante" permaneció en los gradientes después de la incubación con el anticuerpo AE-1, lo que sugiere que la inclusión de la enzima en la micela impide su unión al anticuerpo, o que, aunque se forman los inmunocomplejos, la cantidad de lípidos en la micela es lo suficientemente alta para impedir su migración en los gradientes.

Los experimentos de inmunoprecipitación con resina de agarosa (Apdo. IV.2.7) demostraron que la mayor parte (60-70%) de la AChE nativa de SFB (moléculas G_4^S) queda unida al anticuerpo AE-1. Apparently, estos resultados contradicen los del grupo del Prof. Doctor, según los cuales el AE-1 no reconoce la enzima de SFB (Ralston y col., 1985). Tras incubar las moléculas G_4^S de SFB con el anticuerpo AE-1, estos investigadores no observaron variación en el coeficiente de sedimentación de la enzima. La discrepancia entre nuestros resultados y los del Dr. Ralston y col. puede explicarse suponiendo que la afinidad del anticuerpo AE-1 por la AChE de SFB es baja, de manera que los inmunocomplejos se disocian durante la centrifugación de los gradientes (16 h, a 32.000 rpm).

Una vez confirmada la existencia del epítipo para AE-1 en la molécula nativa de AChE de EH, y demostrada en la de SFB, abordamos el estudio de la naturaleza de dicho epítipo. Éste podría residir en una secuencia de aminoácidos conservada en la AChE de distintos orígenes, o, por el contrario, en la conformación de algún dominio de la enzima nativa; en ese caso, el anticuerpo reconocería alguna característica estructural de la molécula de antígeno. Por otro lado, el epítipo podría estar relacionado con la estructura cuaternaria, esto es, con el estado de agregación de la AChE. Esta última posibilidad no era en absoluto descartable, ya que sólo los oligómeros de subunidades catalíticas de AChE (formas A_{12} , G_4 y G_2) de cerebro humano y músculo esquelético de conejo interaccionaban con AE-1, mientras que el

anticuerpo no se ligaba a las moléculas G_1 procedentes de la misma fuente (Apdo. IV.1.2 y **Fig. IV.1a y b**).

Todas las formas moleculares de AChE de cerebro o músculo están compuestas por idénticas subunidades catalíticas tipo T, que proceden de un mismo ARN_m maduro (Apdo. I.4). Por tanto, el anticuerpo AE-1, capaz de distinguir entre los monómeros y el resto de los componentes moleculares de AChE de estos tejidos, debería estar dirigido contra un dominio polipeptídico con una conformación sólo presente en las formas moleculares más complejas, más que contra una secuencia de aminoácidos. No obstante, podría ocurrir que el anticuerpo AE-1 reconociera una secuencia de aminoácidos sólo accesible en las subunidades que componen los oligómeros, pero oculta en el interior de las moléculas G_1 . Otra alternativa sería que la afinidad del anticuerpo AE-1 por su epítipo le permitiera interaccionar de forma estable con los oligómeros de AChE, pero no formar inmunocomplejos duraderos con las moléculas G_1 , aunque el epítipo también estuviera presente en éstas últimas. Por otra parte, y puesto que las distintas formas moleculares de AChE de diferentes (Liao y col., 1992) o incluso del mismo tejido (Campoy y col., 1992; Cabezas-Herrera y col., 1994b) pueden diferir en los patrones de glicosilación (Apdo. I.5.2), el epítipo para AE-1 podría residir en una cadena de azúcares unida a los oligómeros de AChE de cerebro y músculo, pero ausente en los oligosacáridos de las formas monoméricas de la enzima.

Particularmente interesantes son los resultados obtenidos por el Dr. Campoy y col. (1992), quienes, en base a la interacción de las moléculas de AChE con la lectina de *Lens culinaris* (LCA), probaron la ausencia de un núcleo de fucosilación en las formas G_1 del retículo sarcoplásmico de músculo de conejo, núcleo que sí poseían las moléculas más complejas (A_{12} y G_4) del mismo origen. En el Apartado IV.1.1, se describieron algunos ejemplos de epítopos (para los anticuerpos Elec-39 y 2G8) constituidos por carbohidratos, una característica que permite distinguir entre formas moleculares de AChE del mismo o de diferentes tejidos.

De lo expuesto en el párrafo anterior, se infiere que el análisis de la capacidad de AE-1 para reconocer a la AChE desnaturalizada constituía un punto crucial en el estudio sobre la naturaleza (conformacional o secuencial) del epítipo para el anticuerpo. Con este propósito, la AChE purificada de EH se sometió a electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE), tras lo cual, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (**Fig. IV.3**). Se analizó la posible interacción de la AChE desnaturalizada y transferida a la membrana con el anticuerpo AE-1, mediante el inmunoensayo descrito en el Apartado IV.2.4.2. Una porción de la membrana con la muestra, pero incubada sin AE-1, sirvió como “control” del experimento (calle C, **Fig. IV.3**). Después de ensayar la actividad peroxidasa, que se empleó como trazador para detectar la formación de complejos antígeno-anticuerpo, no se apreció ninguna banda en la membrana “control”, pero tampoco en la “prueba” (correspondiente a la muestra de AChE incubada con AE-1; calle P, **Fig. IV.3**). Estos resultados demostraron la ausencia de interacción entre el anticuerpo AE-1 y la AChE de EH desnaturalizada con SDS, y, por tanto, el carácter estructural del epítipo reconocido por el anticuerpo, ya que el determinante antigénico sólo estaba presente en la conformación nativa de la enzima.

Tras el inmunoensayo, la tinción de las membranas “control” y “prueba” con negro de Amido reveló, en ambas, una banda principal de proteína de 76 ± 1 kDa ($n=2$) (**Fig. IV.3**), que coincidía con la masa molecular de la subunidad catalítica de la AChE de EH (Ott y col., 1983). Éste es el resultado esperado cuando, como en nuestro caso, la SDS-PAGE -previa al “Western Blot”- se realiza en condiciones reductoras, para romper los enlaces disulfuro entre las dos subunidades catalíticas componentes de los dímeros de AChE en la membrana de EH. Puesto que la AChE desnaturalizada y reducida no se incubó con glicosidasas, la masa de 76 kDa correspondía a la subunidad glicosilada, y superaba en aproximadamente 15 kDa la masa estimada para la forma desglicosilada (Liao y col., 1992). Así, el experimento de “Western Blot” también

sirvió para demostrar que el epítopo para el anticuerpo AE-1 no residía en los oligosacáridos.

Además, en las membranas “control” y “prueba” teñidas con negro de Amido, se observó una banda de proteína mucho más tenue de 121 ± 2 kDa ($n=2$) (**Fig. IV.3**), que, con toda probabilidad, pertenecía a los dímeros de subunidades catalíticas de la AChE de EH, no disociados a pesar del tratamiento desnaturalizante y reductor. No obstante, el cálculo de la masa molecular de los dímeros no fue del todo correcto, a la vista del valor de 150 kDa determinado por otros autores (Ott y col., 1983). Ello se debió a la imposibilidad de transferir a la membrana de PVDF la proteína estándar de mayor masa (205 kDa), de manera que la recta patrón se diseñó con los valores comprendidos entre 116 kDa y 29 kDa, que era un intervalo poco apropiado para el cálculo de la masa molecular de la proteína. Los dímeros de subunidades, en estado desnaturalizado, tampoco interaccionaron con el anticuerpo AE-1, como probó el inmunoensayo anterior a la tinción con negro de Amido. Por tanto, aunque se mantuvo la asociación dimérica de la AChE de EH, el epítopo reconocido por AE-1 desaparecía al perder la enzima la conformación nativa.

La AChE purificada de SFB se sometió al mismo experimento de SDS-PAGE, electrotransferencia y “blotting” con idénticos resultados. Tras el inmunoensayo con AE-1, no se observó ninguna banda de actividad peroxidasa en la membrana de PVDF, lo que confirmó la naturaleza estructural del epítopo para el anticuerpo. En la **Figura IV.4** se muestra la membrana “prueba” teñida con tinta china, donde se aprecia una banda de proteína de 80 ± 1 kDa ($n=2$), perteneciente a la subunidad catalítica de la AChE de SFB (Apdo. III.3.1).

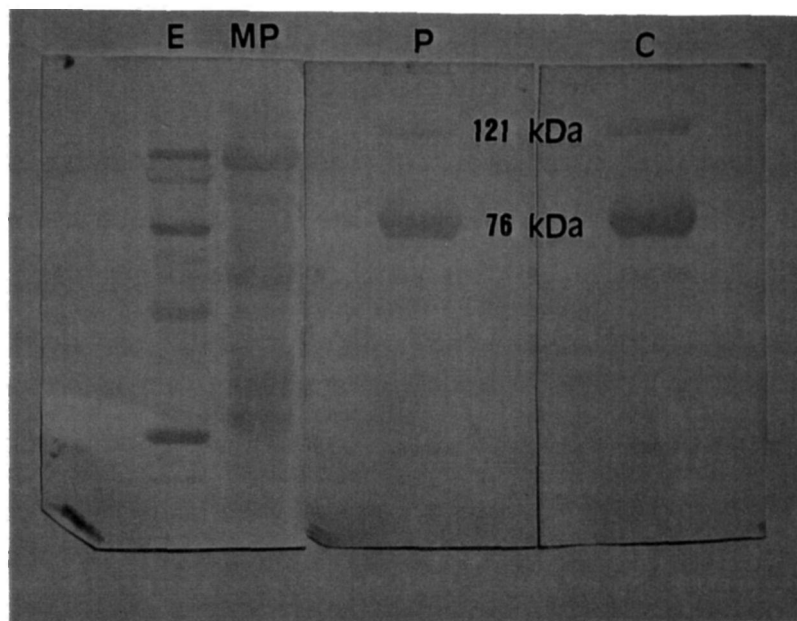


Figura IV.3. Experimento de “Western Blot” para conocer la naturaleza del epítipo reconocido por el anticuerpo AE-1. Se sometió la enzima purificada de EH a SDS-PAGE (4 μ g/calle), e, inmediatamente después, se transfirió a una membrana de PVDF aplicando un voltaje constante (100 V), durante 1 h, a 4°C. La membrana se incubó sin (“control”, calle C) o con (“prueba”, calle P) el anticuerpo AE-1 diluido 1000 veces, y, tras lavar, con un segundo anticuerpo, contra las IgG de ratón, conjugado con peroxidasa. No apareció ninguna banda de actividad peroxidasa (por lo que la membrana en este paso no se muestra). Los resultados demostraban la ausencia del epítipo para AE-1 en la AChE desnaturalizada. Tras el inmunoensayo, la tinción con negro de Amido reveló una banda principal de proteína de 76 kDa (subunidad de AChE) y otra mucho más tenue de 121 kDa (dímero de subunidades). La calle MP corresponde a los marcadores preteñidos empleados para comprobar la adecuada transferencia. La masa molecular de las proteínas problema se determinó por referencia a los estándares de la calle E: β -galactosidasa (116 kDa), fosforilasa b (97,4 kDa), albúmina de suero bovino (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y anhidrasa carbónica (29 kDa).

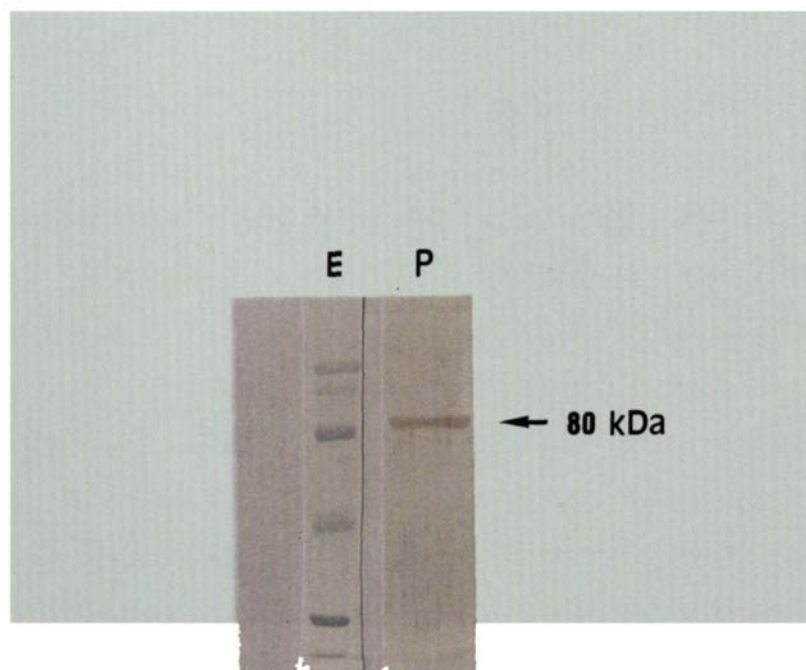


Figura IV.4. “Western Blot” para confirmar el carácter estructural del epítipo reconocido por el anticuerpo AE-1. La AChE purificada de SFB se liofilizó para concentrar la proteína. Después, se sometió la muestra a SDS-PAGE (~ 2,5 $\mu\text{g}/\text{calle}$), electrotransferencia e inmunoensayo con AE-1 como en la Figura IV.3. La ausencia de actividad peroxidasa en la membrana demostró la naturaleza conformacional del epítipo para AE-1. La fotografía muestra la calle “prueba” (P; incubada con AE-1 durante el inmunoensayo) teñida con tinta china, en donde la banda de 80 kDa corresponde a la subunidad de AChE. Los estándares (calle E), teñidos con negro de Amido, como en la Figura IV.3.

3.2. Diferencias en la interacción del anticuerpo AE-1 con los oligómeros y monómeros de AChE

Según se deduce de lo comentado en el apartado anterior, las formas moleculares G_1 de AChE de cerebro humano y músculo esquelético de conejo carecerían de la característica estructural precisa (o epítipo conformacional) reconocida por el anticuerpo AE-1. Así, los monómeros podrían experimentar un reajuste conformacional, más o menos extenso, al asociarse para generar moléculas más complejas, que ahora serían reconocidas por el anticuerpo. Para investigar esta posibilidad, decidimos recorrer el camino inverso, es decir, obtener las formas G_1 a partir de los dímeros y tetrámeros que constituyen, respectivamente, las moléculas nativas de AChE de EH y SFB, y, a continuación, ensayar su interacción con el anticuerpo AE-1. En este sentido, nos sería de gran utilidad, al menos en el caso de la AChE de SFB, la experiencia adquirida en el Capítulo III, donde, de hecho, se demostró la existencia de cambios conformacionales en la enzima cuando las moléculas G_4^S nativas se transformaban en monómeros. Estos cambios eran suficientemente importantes para modificar las propiedades hidrofílicas de la AChE de SFB, posiblemente por exposición al medio externo de dominios polipeptídicos hidrofóbicos, que permanecían ocultos en la forma molecular G_4^S nativa. Esta circunstancia determinaba el carácter anfifílico de las moléculas G_1 generadas a partir de los tetrámeros hidrofílicos. Algo parecido podía ocurrir con el epítipo para el anticuerpo AE-1, pero, esta vez, se trataría de un dominio conformacional sólo expuesto en los oligómeros.

El primer paso consistió en obtener formas moleculares G_1 activas por reducción y alquilación de los dímeros de AChE purificada de EH. Tras el tratamiento con β -ME y IA, según el protocolo descrito en el Apartado IV.2.3, se recuperó alrededor del 45% de la actividad AChE original. La enzima reducida se centrifugó en gradientes de densidad con Brij 96 al 0,5% (p/v), para separar las formas moleculares. Los perfiles de sedimentación mostraron como la actividad AChE se repartía, casi por igual, entre dos picos de $4,2 \pm 0,3S$ ($n=3$) y

$2,4 \pm 0,2S$ ($n=3$) (**Fig. IV.5a**); no obstante, una parte de la actividad quedaba en forma agregados en la zona intermedia-alta del gradiente, seguramente a causa del carácter fuertemente anfifílico de las moléculas generadas por reducción. El valor de $4,2S$ coincidía con el coeficiente de sedimentación estimado para los dímeros nativos de AChE de EH (**Fig. IV.2**, perfil representado por los círculos), mientras que el pico de $2,4S$ pertenecía a las moléculas G_1 procedentes de la disociación de las subunidades por la ruptura de los enlaces disulfuro. Para obtener una cantidad significativa de las formas G_2 y G_1 separadas, se mezclaron las fracciones de los gradientes que contenían los dímeros, y, por otro lado, las correspondientes a los monómeros. En ambos casos, la mezcla se dializó durante 24 h, a $4^\circ C$, frente a NaCl $0,15$ M, Brij 96 al $0,01\%$ (p/v) en Tris-HCl 50 mM, pH $7,5$, para eliminar la sacarosa. Cada muestra dializada se sometió a un segundo análisis de sedimentación en un gradiente con Brij 96 al $0,5\%$. Las **Figs. IV.5b** y **IV.5c** muestran, respectivamente, los perfiles de las moléculas G_2 (de $4,2S$) y G_1 (de $2,4S$) perfectamente aisladas tras el tratamiento reductor de la AChE nativa de EH y la doble centrifugación en gradiente. Una vez aisladas, las formas G_2 y G_1 se emplearon para investigar su posible interacción con el anticuerpo AE-1.

Por otra parte, la AChE purificada de SFB se trató con DTT y NEM (Apdo. III.2.3), para generar moléculas más simples por reducción de las formas G_4^S . Tal y como se comentó en el Apartado III.3.1, tras el tratamiento, se recuperó el 40% de la actividad AChE de partida. Las formas moleculares activas se identificaron en gradientes de densidad con Brij 96 al $0,5\%$ (p/v), obteniéndose un pico principal ($\sim 70\%$ de la actividad recuperada) de moléculas tetraméricas de $10,6 \pm 0,1S$ ($n=5$), otro ($\sim 30\%$ restante) de monómeros de $2,6 \pm 0,1S$ ($n=5$), y un hombro (nunca más del 5%) de $4,4 \pm 0,2S$ ($n=5$) perteneciente a pequeñas cantidades de formas G_2 (**Fig. IV.6a**). Se juntaron las fracciones del hombro procedentes de distintos gradientes, y se dializaron frente a NaCl $0,15$ M, Brij 96 al $0,01\%$ (p/v) en Tris-HCl 50 mM, pH $7,5$, durante 24 h, a $4^\circ C$. La muestra dializada se centrifugó, de nuevo, en gradientes de densidad con Brij 96 al $0,5\%$, y el perfil resultante (**Fig. IV.6b**) reveló un solo pico de actividad

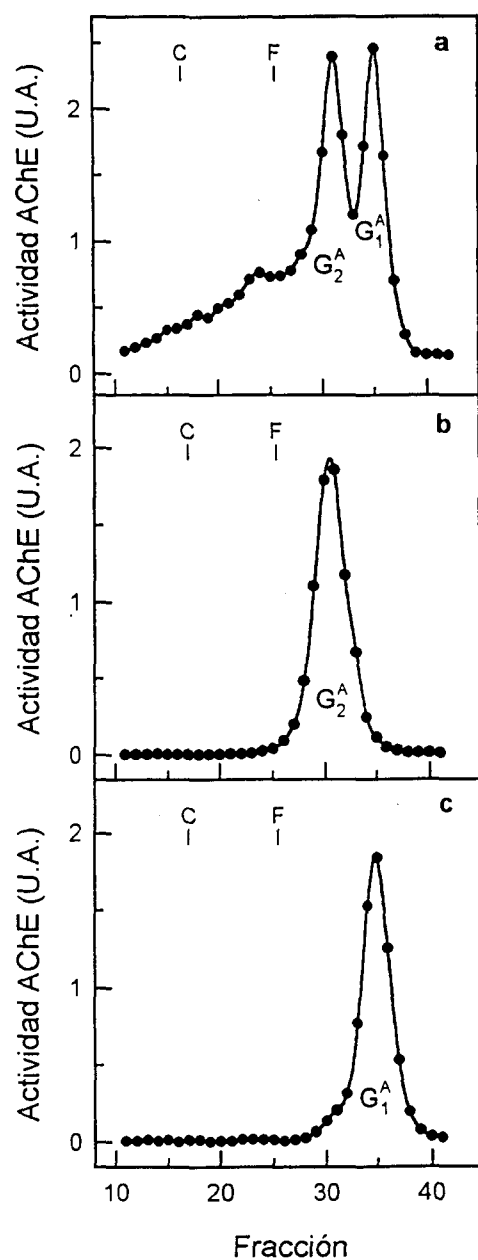


Figura IV.5. Aislamiento por centrifugación en gradientes de sacarosa de las formas moleculares de AChE de EH obtenidas tras el tratamiento con β -ME y IA. La AChE purificada de EH (moléculas G_2^A) se incubó con β -ME y IA, para romper los enlaces disulfuro entre las subunidades, y, a continuación, se depositó en gradientes de densidad con Brij 96, para separar las formas moleculares. Las condiciones de centrifugación y medida de la actividad AChE (en las fracciones procedentes del gradiente) como en la Figura IV.1, pero sin iso-OMPA en el medio de reacción. Las enzimas marcadoras como en la Figura IV.2. Los perfiles de sedimentación mostraron dos picos de actividad AChE, correspondientes a las moléculas G_2 y G_1 (a). Se juntaron las fracciones con los dímeros, se dializaron y, por último, se sometieron a un segundo análisis de sedimentación en las mismas condiciones que el primero, obteniéndose un único pico de actividad AChE (b). Con las fracciones que contenían los monómeros se procedió igual, y el perfil de sedimentación se muestra en IV.5c. Las moléculas G_2^A y G_1^A aisladas se utilizaron en el inmunoensayo de la Figura IV.7A.

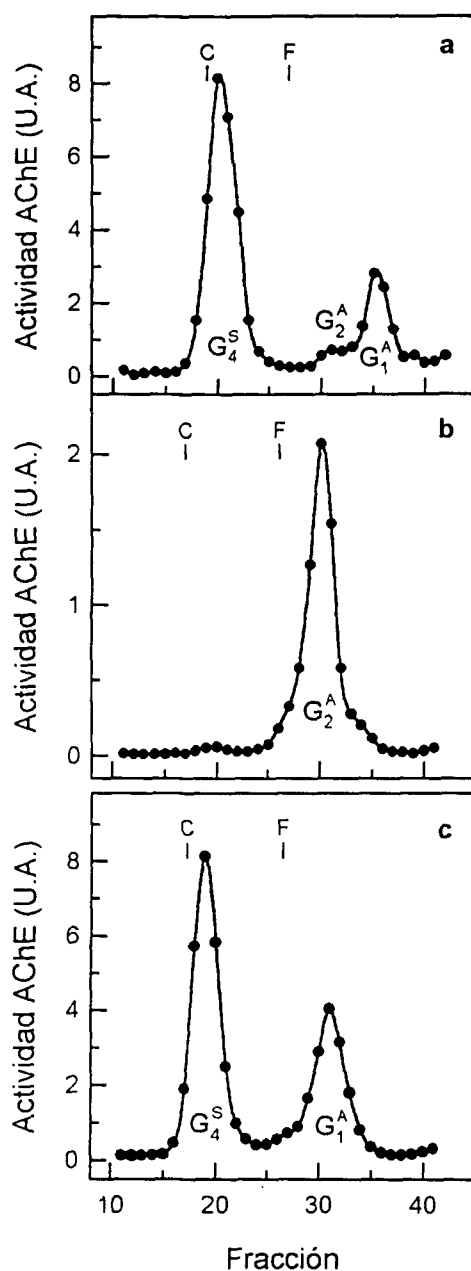


Figura IV.6. Perfiles de sedimentación que muestran las formas moleculares de AChE de SFB aisladas tras la reducción y alquilación. La AChE purificada de SFB (moléculas G_4^S) se incubó con DTT y NEM. La muestra con las formas moleculares generadas por el tratamiento reductor se depositó en gradientes con Brij 96 al 0,5% (p/v) (a) o CHAPS al 0,1% (p/v) (c), y se centrifugó como en la Figura IV.5, determinándose la actividad AChE en ausencia de iso-OMPA. Las moléculas G_4^S y G_1^A se tomaron de los picos de los perfiles de sedimentación. Para aislar una cantidad significativa de formas G_2^A , las fracciones (con estas moléculas) de varios gradientes con Brij 96 se mezclaron y se sometieron a un segundo análisis de sedimentación (b), también con Brij 96 en el gradiente. Los tetrámeros, dímeros y monómeros aislados se emplearon para investigar su interacción con el anticuerpo AE-1 (Figura IV.7A y B).

AChE de $4,3 \pm 0,3S$ ($n=3$) correspondiente a las moléculas G_2 aisladas, sin ninguna señal de tetrámeros y monómeros contaminantes.

Las formas moleculares activas G_4 , G_2 y G_1 de AChE de SFB, y las G_2 y G_1 de la enzima de EH, procedentes de los respectivos tratamientos de reducción y alquilación y aisladas en gradientes de densidad con Brij 96, se incubaron con el anticuerpo AE-1 fijado a los pocillos de una placa de poliestireno (Apdo. IV.2.6). Después de lavar varias veces los pocillos con tampón Tris salino, se midió la actividad AChE unida a AE-1, y se comprobó que sólo las moléculas G_1 de SFB eran incapaces de formar complejos con el anticuerpo (**Fig. IV.7A**). Por el contrario, los monómeros de AChE obtenidos a partir de los dímeros de EH (el antígeno contra el cual se genera el anticuerpo) se ligaban a AE-1, indicando que el epítipo conformacional se conservaba en las subunidades catalíticas disociadas.

Según se comentó en el Apartado III.3.1, el marcaje de la AChE nativa de SFB con [3H]-DFP demostró que la reducción de la enzima con DTT y NEM generaba un importante número de moléculas G_1 inactivas (**Fig. III.3d**), junto con los monómeros (minoritarios) que conservaban la actividad tras el tratamiento. Los datos de fluorescencia intrínseca de la proteína y de la sonda anfifílica ANS revelaron que las moléculas G_1 inactivas, originadas por la reducción de la AChE de SFB, permanecían en una conformación "similar a la nativa" (Apdo. III.3.2 y **Figs. III.5 y III.6**). Si el epítipo para el anticuerpo AE-1 se mantuviera en la conformación inactiva, tales moléculas competirían con las activas para unirse al anticuerpo fijado a los pocillos de poliestireno en el ensayo de la **Figura IV.7A**. Evidentemente, ambas formas se aíslan conjuntamente en los análisis de sedimentación, por lo que los monómeros inactivos, en número muy superior, podrían impedir en gran medida que la actividad AChE se ligara a AE-1, falseando los resultados del inmunoensayo. La otra posibilidad sería que tanto las moléculas G_1 activas, como las inactivas, no interaccionaran con el anticuerpo AE-1.

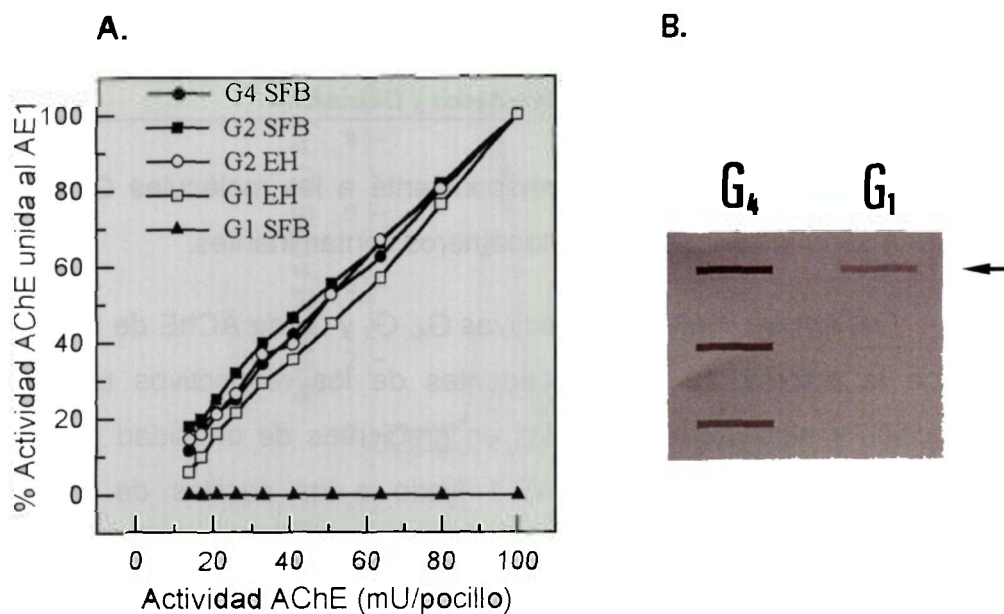


Figura IV.7. Interacción del anticuerpo AE-1 con las formas moleculares de AChE de EH o SFB. Los dímeros y tetrámeros que constituyen, respectivamente, las moléculas nativas de AChE de EH y SFB se incubaron con un agente reductor y otro alquilante. Tras el tratamiento, algunas moléculas de enzima conservaron su estado de agregación original, pero también se generaron moléculas más simples tras la disociación de las subunidades (dímeros y monómeros en el caso de la AChE de SFB, y monómeros en el de la enzima de EH). Según se describe en las Figuras IV.5 y IV.6, las distintas formas moleculares se aislaron por centrifugación en gradientes de densidad con Brij 96 (para el ensayo tipo ELISA descrito en A) o CHAPS (para el experimento de "Slot-Blot" de B).

A. Inmunoensayo tipo ELISA con el anticuerpo AE-1 fijado a los pocillos de una placa de poliestireno. El AE-1 se ligó al poliestireno a través de un primer anticuerpo contra IgG de ratón. Las formas moleculares aisladas de AChE de EH o SFB (tetrámeros, dímeros y monómeros) se diluyeron en tampón Tris salino con Tween 20 al 0,1% (p/v). En los pocillos se depositaron 100, 80, 64, 51, 41, 33, 26, 21, 17 o 14 mU de actividad (1 U = 1 μ mol de ATCh hidrolizado por h) de la preparación con cada forma molecular. Tras incubación y lavar los pocillos, se midió la actividad AChE reconocida por AE-1. En la gráfica se representan las mU/pocillo frente al porcentaje de actividad ligado a AE-1, considerando el 100% a la actividad unida al depositar 100 mU en el pocillo. En cada caso, el porcentaje de actividad fijada al anticuerpo es la media de, al menos, cuatro determinaciones. Se aprecia en la figura que las moléculas G₁ de SFB no interaccionaron con el anticuerpo AE-1.

B. Experimento de "Slot-Blot". Las moléculas G₄ y G₁ de AChE de SFB se aislaron en gradientes de densidad con CHAPS al 0,1% (p/v) y se dializaron por separado frente a CHAPS (0,002% p/v) en tampón Tris salino. Cada forma molecular se fijó a la membrana de nitrocelulosa aplicando vacío. Después de lavar y bloquear la membrana, ésta se incubó con el anticuerpo AE-1 diluido 1000 veces y, tras nuevos pasos de lavado, con un segundo anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa. La actividad peroxidasa se reveló con diaminobenzidina. La actividad AChE (en μ moles de ATCh hidrolizados por h) depositada en la membrana fue (de arriba a bajo): 65, 45 y 35 U de las formas G₄ y 65 U de las G₁. Obsérvese la diferencia de intensidad de color en los pocillos con las mismas unidades de AChE de las formas G₁ y G₄ (flecha).

Para investigar las distintas posibilidades, la AChE de SFB se incubó con DTT y NEM, y las formas moleculares G_4 y G_1 procedentes del tratamiento se separaron por centrifugación en gradientes de sacarosa con CHAPS al 0,1% (p/v). El perfil de sedimentación, muy parecido a los obtenidos con otros detergentes, mostró dos picos de actividad AChE: uno principal de $10,4 \pm 0,2S$ ($n=4$) y otro de $4,2 \pm 0,2S$ ($n=4$), debidos a los tetrámeros y monómeros, respectivamente, sin que se apreciase el hombro de moléculas G_2 (**Fig. IV.6c**). La muestra conteniendo cada una de las formas moleculares (obtenida al juntar las fracciones de los respectivos picos) se dializó frente a CHAPS al 0,002% (p/v), NaCl 0,5 M en 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, para rebajar la concentración del detergente. Después, las formas aisladas de AChE se fijaron a una membrana de nitrocelulosa aplicando vacío (Apdo. IV.2.5), y se analizó su posible interacción con el anticuerpo AE-1 mediante el inmunoensayo descrito en el Apartado IV.2.4.2. Los resultados del experimento de "Slot-Blot" (**Fig. IV.7B**) demostraron que AE-1 se ligaba a las moléculas G_4 de AChE de SFB; sin embargo, el anticuerpo no formaba inmunocomplejos, o en muy pequeña cantidad, con las formas monoméricas (activas o inactivas) de la enzima.

Resumiendo, el epítipo para el anticuerpo AE-1 reside en una conformación propia de un dominio polipeptídico de la AChE nativa de EH (Apdo. IV.3.1). La enzima de EH es una molécula dimérica, pero el epítipo reconocido por AE-1 se mantiene en las subunidades catalíticas disociadas (**Fig. IV.7A**), que conservan la actividad enzimática tras el tratamiento reductor que las generó. Según los resultados obtenidos por otros autores (Sorensen y col., 1987; Olson y col., 1990), ocurre igual con el epítipo para el anticuerpo AE-2, que no depende del estado de agregación de la AChE de EH. Por otra parte, aunque el AE-1 interacciona con los oligómeros activos de la AChE de SFB, cerebro humano y músculo esquelético de conejo, el anticuerpo no se liga, o lo hace muy débilmente, a los monómeros de la enzima procedentes de dichas fuentes (**Fig. IV.7A y B; Fig. IV.1a y b**), si bien, éstos presentan una conformación nativa (formas G_1 activas) o "similar a la nativa" (formas G_1 inactivas de SFB). La ausencia de interacción entre estas moléculas

monoméricas y AE-1 se debería, más que a un reajuste conformacional mínimo (pero suficiente para modificar u ocultar el epítipo para el AE-1), a la baja afinidad del anticuerpo por la AChE de otros orígenes distintos de la membrana de EH, ya que el anticuerpo AE-1 sí reconoce los monómeros obtenidos a partir de la enzima de EH (su antígeno natural), demostrando, al menos en este caso, la inexistencia de un cambio conformacional (asociado a la monomerización) que afecte al epítipo. Así, en la AChE de SFB, cerebro humano y músculo esquelético de conejo, AE-1 se fijaría a los oligómeros para formar inmunocomplejos mucho más estables que en el caso de los monómeros, posiblemente, a través de la interacción del anticuerpo con dos subunidades catalíticas del mismo o distinto oligómero.

La incapacidad de AE-1 para unir eficazmente los monómeros de AChE no procedentes de EH determina que el citado anticuerpo sea inadecuado, por ejemplo, para localizar por técnicas inmunocitoquímicas dichos componentes moleculares en el cerebro o músculo de mamíferos. Sin embargo, en el cerebro de personas fallecidas a causa de la demencia de Alzheimer, el anticuerpo AE-1 podría emplearse para investigar la disminución selectiva de las moléculas G_4 , disminución que modifica el balance G_4/G_1 y que, según se cree, está relacionada con la degeneración de los elementos presinápticos de algunas regiones cerebrales en pacientes de Alzheimer (Apdo. I.6).

Respecto a la localización del epítipo para AE-1 en la molécula de AChE, el Prof. Olson y col. (Olson y col., 1990) han demostrado que este anticuerpo no compite con el AE-2 para unirse a la enzima, pero sí impide en un 70-90% la formación de complejos entre el C1B7 y la AChE; el AE-2 y el C1B7 son dos anticuerpos inhibidores de AChE. El epítipo para AE-2 probablemente se encuentra próximo al extremo amino terminal (entre los aminoácidos 53-84) de la subunidad catalítica de la AChE de SFB (Doctor y col., 1989). Por tanto, el determinante conformacional reconocido por el anticuerpo AE-1 se localizaría lejos de la región N-terminal, pero próximo o solapado con el dominio reconocido por el anticuerpo C1B7.

CAPÍTULO V

ENSAYOS CON PROTEÍNA QUINASA A

1: INTRODUCCIÓN

1.1. Precedentes sobre la posible fosforilación de AChE con proteína quinasa A

Según un reciente trabajo del grupo de la Dra. Soreq (Grifman y col., 1997), la AChE de distintos orígenes incorpora restos de fosfato tras la incubación con la proteína quinasa dependiente de AMP_c (proteína quinasa A, PKA). Esta afirmación se basa en pruebas experimentales directas, ya que la AChE, en medios con [γ -³³P]-ATP y PKA, incorpora ³³P, como demuestran la posterior separación electroforética de las dos enzimas y la autorradiografía del gel. Además, siempre según estos autores, la AChE tratada con PKA hidroliza más eficientemente la ATCh, lo que sugiere que la fosforilación de la enzima puede ser importante desde el punto de vista fisiológico.

Puesto que la AChE desempeña un papel crucial en la transmisión colinérgica, debe haber mecanismos para regular su actividad enzimática en cortos intervalos de tiempo, en respuesta a distintas condiciones fisiológicas. Ello excluye que la regulación ocurra a nivel de la expresión genética, del ensamblado de las subunidades enzimáticas para generar formas moleculares complejas, o de la glicosilación intracelular de dichas formas, ya que estos niveles de control no ofrecerían una respuesta lo suficientemente rápida. Por otra parte, aunque se conocen mecanismos alostéricos que regulan la actividad AChE (Barak y col., 1995), todavía no se ha demostrado que actúen de manera eficaz en las sinapsis colinérgicas. En este contexto, el trabajo del grupo de la Dra. Soreq resulta absolutamente novedoso, porque nadie antes había demostrado la fosforilación de la AChE ni sugerido su posible relevancia fisiológica, a pesar de que la fosforilación constituye el mecanismo postraducciona l de control de las funciones biológicas más frecuente, y de que la secuencia de aminoácidos de la AChE humana posee varios sitios

potenciales de fosforilación (secuencias consenso reconocidas por las quinasas) (Soreq y Zakut, 1993).

La Dra. Grifman y col. (1997) aseguran que la PKA fosforila *in vitro* la AChE humana recombinante expresada en las células 293 de riñón o en *Escherichia coli*, así como la AChE purificada de cerebro o eritrocito humanos. Según estos autores, la PKA también fosforila la AChE de eritrocito bovino, pero no la BuChE humana. La AChE no sufre fosforilación con caseína quinasa II ni con proteína quinasa C.

La PKA, la proteína quinasa C y la caseína quinasa II catalizan la reacción de transferencia del tercer grupo fosfato (γ -P) del ATP a serina o treonina de las proteínas sustrato. La PKA requiere AMP_c para ejercer su función, y la proteína quinasa C opera con Ca⁺² y otros mensajeros. En cambio, no es necesaria la generación de segundos mensajeros para que la caseína quinasa II exprese su actividad enzimática (Wang y Roach, 1993). La PKA está constituida por dos subunidades reguladoras (R) y dos catalíticas (C), que se asocian formando una estructura tetramérica (R₂C₂). La unión del AMP_c a las subunidades R libera las C, que sólo entonces son catalíticamente activas. Existen dos holoenzimas de la PKA, la holoenzima tipo I y la tipo II, que difieren en sus subunidades reguladoras (RI y RII), aunque poseen idénticas subunidades C (Bossemeyer y col., 1996).

La PKA reconoce secuencias específicas con restos de aminoácidos básicos en posición N-terminal respecto a la de la serina o treonina susceptibles de fosforilación (Apdo. V.2.3). Lógicamente, en la conformación nativa de la proteína, sólo las secuencias consenso localizadas en la superficie de la molécula serán accesibles a la PKA. La AChE de mamíferos muestra un solo sitio potencial de fosforilación para PKA en la superficie de la proteína nativa, la treonina 249 (T249, según la numeración de aminoácidos de la AChE humana) (Grifman y col., 1997). Por tanto, en principio cabe suponer que la fosforilación de la enzima tendrá lugar en dicha treonina. Aunque se han identificado 3 secuencias consenso en la superficie de la AChE humana (S128, S355 y T466)

para caseína quinasa II, y una (T11) para proteína quinasa C, ninguna de estas quinasas transfiere grupos fosfato a la AChE (Grifman y col., 1997).

La actividad AChE de mamíferos y de *Torpedo* se incrementa tras el tratamiento con PKA (Grifman y col., 1997). Ello sorprende en el caso de la enzima de *Torpedo* porque carece de la T249, así como de secuencias consenso para la fosforilación en las regiones externas de la molécula. Los datos llevan a pensar que los grupos fosfato podrían incorporarse a secuencias no "consenso". Para aceptar o rechazar esta posibilidad, se ha recurrido a la mutagénesis dirigida, de modo que la treonina de la posición 249 se ha sustituido por alanina en la AChE humana. El mutante T249A conserva su capacidad para hidrolizar la ATCh y, a pesar de la sustitución del aminoácido, la enzima mutada sufre fosforilación con PKA y el consiguiente aumento de la actividad, como sucedía con la enzima nativa. De ahí se concluye que la fosforilación ocurre en restos de treonina/serina no incluidos en secuencias consenso (Grifman y col., 1997), un fenómeno que ya se ha descrito para otras proteínas (Seibert y col., 1995).

Aunque la fosforilación supone un aumento de la eficiencia de la AChE para hidrolizar la ATCh, tal modificación covalente no altera la afinidad de la enzima por el sustrato ni por diferentes inhibidores (tacrina, fisostigmina, ecotiopato o fasciculina, una proteína del veneno de serpiente). Por el momento, se desconocen los cambios estructurales que induce la fosforilación para que se incremente la hidrólisis del sustrato sin cambiar la afinidad. El fenómeno se podría explicar si aumentara la velocidad de exclusión de los productos de reacción (Grifman y col., 1997).

Se ha propuesto que la fosforilación de la AChE podría representar un rápido mecanismo de retroalimentación ("feedback") capaz de compensar, hasta un límite, la caída de actividad AChE tras la exposición a gases nerviosos, a los insecticidas organofosforados y carbamatos y a otros agentes naturales o químicos inhibidores de la enzima, consiguiendo mantener la transmisión colinérgica normal en esas circunstancias (Grifman y col., 1997). De confirmarse

esta hipótesis, la AChE entraría a formar parte de las otras proteínas implicadas en la sinapsis colinérgica, colina acetiltransferasa y receptor nicotínico, cuya actividad también parece estar regulada por fosforilación/desfosforilación (Schmidt y Rylett, 1993; Hoffman y col., 1994). La fosforilación del receptor nicotínico tiene lugar *in vivo*, y lo hace menos susceptible a la acción de la ACh (L'Na y Changeux, 1993; Hoffman y col., 1994). Posiblemente, al acelerar la hidrólisis del neurotransmisor, la fosforilación de la AChE actúe en el mismo sentido, retardando la apertura del canal del receptor.

La Dra. Grifman y col. (1997) han observado que, tras la incubación con PKA, el aumento de la actividad AChE varía en función del origen de la enzima. Por ejemplo, el factor de activación es de 9,3 en el caso de la AChE humana recombinante expresada en células de la línea 293, y de 4 y 2,5 para la enzima humana purificada de eritrocito y cerebro, respectivamente. Sin embargo, según los datos de electroforesis y autorradiografía, la cantidad de ^{33}P incorporado es similar en todos los casos. Ello podría indicar que aunque sean muchos los restos de serina/treonina fosforilados *in vitro*, sólo algunos de éstos cambian las propiedades catalíticas de la enzima. Dependiendo de la fuente de AChE, los sitios catalíticamente "efectivos" habrían incorporado en mayor o menor medida los grupos fosfato *in vivo*, manteniéndolos unidos (o no) durante los diferentes procesos de purificación.

De hecho, los mismos investigadores han demostrado que la fosforilación de parte de las moléculas de AChE sucede *in vivo*. Así, el tratamiento con fosfatasa alcalina (FA) aumenta el punto isoeléctrico y cambia la movilidad electroforética de una fracción de las moléculas de AChE humana, lo que se atribuye a la pérdida de grupos fosfato, con carga negativa, que inicialmente estaban unidos a la proteína.

En el líquido cefalorraquídeo de los pacientes de Alzheimer se ha detectado una banda anómala de AChE por isoelectroenfoque (Perry y col., 1985; Navaratnam y col., 1991; Smith y col., 1991). En principio, se piensa que procede de alteraciones en la glicosilación de la enzima (Sáez-Valero y col.,

1997). No obstante, si la hiperfosforilación de los filamentos tau (Trojanowski y Lee, 1995) del cerebro de los pacientes refleja un exceso de actividad quinasa, posiblemente, también la AChE se encuentre hiperfosforilada bajo tales circunstancias. Este hecho podría explicar la aparición de la nueva banda de AChE por isoelectroenfoque.

Como se comentó en el Apartado I.3.3, hay motivos fundados para relacionar las acciones morfogenéticas de las colinesterasas con fenómenos de interacción celular. En las interacciones proteína-proteína, la fosforilación de los aminoácidos de la periferia de la proteína desempeña, probablemente, un papel relevante. La neurotactina, una proteína de adhesión celular que comparte motivos secuenciales con la AChE, incorpora grupos fosfato *in vivo* (Barthalay y col., 1990). Por tanto, la fosforilación de la AChE podría no sólo regular la acción de la enzima en las sinapsis colinérgicas, sino también las otras funciones alternativas (Apdo. I.3).

Partiendo de los resultados del grupo de la Dra. Soreq, nuestro objetivo inicial consistió en localizar y secuenciar los sitios de fosforilación en la molécula de AChE.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

La AChE purificada de eritrocito se consiguió por gentileza del Dr. Brodbeck de la Universidad de Berna. La PKA procedía de Promega (número de catálogo, V516a), y la FA de Boehringer Mannheim (n° cat., 713023).

De Sigma y Hartmann Analytic se obtuvieron el ATP y el [γ - 33 P]-ATP, respectivamente. El kemptide (n° cat., M-1510) se compró a Bachem, el papel de fosfocelulosa (P81) a Whatman y la mezcla de anfolitos (10043) para el isoelectroenfoque a Fluka.

2.2. Incubación con proteína quinasa A

Se investiga la posible fosforilación con proteína quinasa A (PKA) de la AChE purificada de la membrana de eritrocito bovino (2.700 U/ml; 5.400 U/mg) o humano (2.024 U/ml; 5.060 U/mg). Las muestras de AChE de las dos fuentes fueron amablemente suministradas por el Dr. Brodbeck de la Universidad de Berna (Brodbeck y col., 1981). La actividad específica de las muestras se expresa en μ moles de ATCh transformados por min y mg de proteína.

Entre 18 y 30 U de AChE (esto es, $\sim 3,5$ -6 μ g de proteína) se incuban, 90 min a 30°C, con un tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 que contiene MgCl₂ 18 mM, Triton X-100 al 0,1%, ATP 0,2 mM, 25 μ Ci de [γ - 33 P]-ATP y 150 unidades de PKA. El volumen final es de 50 o 100 μ l; en este último caso, la incubación se realiza con 50 μ Ci de ATP radiactivo y 300 unidades (U) de PKA. Una unidad de actividad PKA es la cantidad de enzima que incorpora 1 pmol de fosfato al sustrato apropiado (caseína o kemptide) en 1 min. Las disoluciones de partida son: MgCl₂ 0,18 M, Triton X-100 al 1% (p/v) en Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5, ATP 4 mM en agua, [γ - 33 P]-ATP 10 mCi/ml (Hartmann Analytic) y PKA 60 U/ μ l

(Promega), y se completa el volumen final con agua. En todos los experimentos se prepara un control sin PKA.

Promega suministra la subunidad catalítica purificada de la PKA, libre de la subunidad reguladora de la enzima, y por ello no es necesario añadir AMP_c al medio de reacción (Apdo. V.1.1). Para catalizar la transferencia del tercer grupo fosfato (γ -P), se debe añadir al medio de incubación PKA, ATP y un catión divalente (Mg^{+2} , Mn^{+2} o Co^{+2}). En presencia de Mg^{+2} , la K_m para el ATP es del orden de 10 μM . Por tanto, en nuestro ensayo el ATP está en concentración de saturación (0,2 mM, 20 veces el valor de K_m), según recomiendan diversos autores (ver por ejemplo, Wang y Roach, 1993). En cuanto al $[\gamma\text{-}^{33}P]\text{-ATP}$, la actividad específica si se ponen 25 μCi en el medio de reacción es de 5.500 cpm por pmol de ATP no radiactivo ($1\mu Ci = 2,2 \times 10^6$ cpm), y si se agregan 50 μCi de 11.000 cpm/pmol, valores muy superiores al empleado (100-200 cpm/pmol), por ejemplo, para incorporar ^{33}P al kemptide (Wang y Roach, 1993). El uso de $[\gamma\text{-}^{33}P]\text{-ATP}$, en lugar de $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{-ATP}$, proporciona varias ventajas, como una mejor resolución en las autorradiografías con tiempos de exposición más cortos; además, la vida media de este isótopo es mayor (25 días frente a los 14 del ^{32}P).

La muestra tratada o no con la PKA se somete a electroforesis desnaturante y posterior autorradiografía (Apdo. V.2.6), o se mide en ella la actividad AChE, para investigar posibles modificaciones en la capacidad de hidrólisis de la ATCh debidas a la acción de la PKA. En este último caso, no se incluye $[\gamma\text{-}^{33}P]\text{-ATP}$ en el medio de reacción. La AChE purificada de SFB (Apdo. II.2.2) también se incuba con PKA (150 unidades) y ATP (0,2 mM), en ausencia de $[\gamma\text{-}^{33}P]\text{-ATP}$, midiéndose su actividad hidrolítica antes y después del tratamiento.

2.3. Ensayo de proteína quinasa A

Para comprobar que la PKA utilizada en los experimentos previos (Apdo. V.2.3) funciona correctamente para la transferencia del fosfato, se lleva a cabo

este ensayo, que emplea el kemptide como sustrato de la enzima (Kemp y col., 1991; Wang y Roach, 1993).

El kemptide (Kemp y col., 1977) es un péptido sintético de 7 aminoácidos (S-L-G), que reproduce la secuencia del sitio de fosforilación de la quinasa de hígado, un sustrato fisiológico de la PKA. La presencia de aminoácidos básicos, preferiblemente arginina, en posición N-terminal a la de la serina (o treonina) que acepta el fosfato resulta determinante para que la PKA reconozca el sitio de fosforilación. Tras analizar las secuencias de aminoácidos en las que se produce la fosforilación por PKA, se ha encontrado que muchas de las proteínas diana poseen la secuencia consenso R-X-S/T (X puede ser cualquier aminoácido). En general, en la C-terminal se localiza un aminoácido hidrofóbico (por ejemplo, leucina) (Kemp y col., 1996).

El kemptide es un sustrato excelente de la PKA con una K_m de 16 μM y una v_m de 20 $\mu\text{moles/min/mg}$. Además, a nivel experimental, los dos restos de aminoácidos en el péptido suponen una gran ventaja, debido a que las cargas de estos aminoácidos interaccionan con los grupos fosfato con carga negativa en el papel de fosfocelulosa. De este modo, tras la incubación con la posible separar el kemptide con el ^{33}P incorporado del $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ que se ha incorporado. Básicamente, el ensayo consiste en transferir la mezcla de la enzima con la PKA, el kemptide y el $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ a trocitos de papel de filtro Whatman de 3 mm de diámetro numerados y sumergir éstos en un recipiente con ácido fosfórico. Después del lavado, la radiactividad fijada a los papeles se mide en un contador de scintilación. Algunas proteínas básicas, como las histonas (sustratos naturales de la PKA), se unen a la fosfocelulosa y, por tanto, también se unen en este tipo de ensayos. En el caso de algunos péptidos con sólo dos aminoácidos básicos (el kemptide y otros), es absolutamente necesario sumergir los trocitos en un medio ácido, para neutralizar las cargas negativas del grupo fosfato y evitar la repulsión de cargas entre los aminoácidos de la molécula que se quiere fijar y los de la celulosa.

Para el ensayo, se prepara el medio de reacción a partir de MgCl_2 28 mM en Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, la disolución de ATP (1 mM en agua) y la de kemptide (5 mM en agua). El $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ utilizado (1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) se obtiene diluyendo el reactivo comercial (10 mCi/ml, Hartmann Analytic) en agua. Se numeran 4 viales, y en cada uno se deposita el volumen adecuado de las disoluciones de partida, para obtener 49 μl de la siguiente mezcla de reacción: MgCl_2 14 mM, kemptide 0,1 mM, ATP 0,2 mM, 1 μCi de $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ en Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 (el volumen se completa con agua). La actividad específica del $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ en el medio es de 220 cpm/pmol de ATP no radiactivo. A continuación, se añade 1 μl de una disolución de PKA (60 U/ μl , Promega) a los viales 1 y 1', y el mismo volumen de agua al 2 y 2', con un intervalo de 30 s entre ellos. Se incuban los viales 12 min a 30°C, y la reacción se detiene con 200 μl de H_3PO_4 al 10% (v/v), que se depositan en los viales respetando el orden y el intervalo de 30 s. De cada mezcla se aplican 200 μl a un trocito (5x5 cm) de papel de fosfocelulosa numerado, y los cuatro trozos se dejan secar al aire durante 1,5 h. Transcurrido el tiempo, los papeles se lavan 5 veces con H_3PO_4 al 0,5% (v/v), tras lo cual, se secan con un secador para el pelo. Cada papel se introduce bien doblado en un vial de centelleo, al que se añaden 10 ml de cóctel de Bray (Apdo. II.2.6). La radiactividad en los viales se mide en un contador de radiación beta (LBK 1217 Rackbeta Counter).

2.4. Incubación con fosfatasa alcalina

La AChE purificada de EH (400 U; 1 U = 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$) se incuba con 40 U de fosfatasa alcalina (FA) en un medio con MgCl_2 1 mM, ZnCl_2 0,1 mM, Tritón X-100 al 0,05%, Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, durante 2,5 horas a 37°C. El volumen final es de 270 μl . Las concentraciones finales en el medio de reacción se obtienen a partir de MgCl_2 10 mM, ZnCl_2 1 mM, Triton X-100 al 0,5% (p/v) en Tris-HCl 0,5 M, pH 8,5. Las preparaciones enzimáticas a emplear son una disolución de FA (1.000 U/ml, Boehringer Mannheim) y otra de AChE (2.024 U/ml).

Tras la incubación, se mide la actividad AChE y FA (Apdo. V.2.5) en la muestra, que, a continuación, se pasa por una pequeña columna (~ 1 ml de resina) de edrofonio ligado a la sepharose a través de un "brazo espaciador" (Edf-esp-sepharose). El Dr. Brodbeck (Brodbeck y col., 1981) suministró gentilmente la matriz de afinidad. Antes de pasar la muestra, la columna se equilibra con 10 ml de NaCl 0,14 M, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, NaN₃ al 0,05% (p/v), Triton X-100 al 0,05% (p/v) en Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 (tampón A de equilibrio). El edrofonio, unido al gel a través de un "espaciador", liga la AChE de la membrana de eritrocito, lo que permite separar las dos enzimas (la AChE y la FA). Después de aplicar la muestra, la columna se lava con 3 ml de tampón A y se recogen manualmente fracciones de ~ 100 µl. Se efectúa un segundo lavado con alta concentración de sal (3 ml de NaCl 0,5 M en tampón A) y, por último, la AChE retenida en la matriz se eluye con edrofonio 10 mM en tampón A, tomando unas 30 fracciones de ~ 100 µl. En todos los pasos se mide la actividad AChE y FA, para comprobar que, efectivamente, las dos enzimas se separan.

Por electroforesis desnaturizante (Apdo. V.2.6) e isoelectroenfoque (Apdo. V.2.7) se investiga la posible desfosforilación de la AChE eluida de la columna de afinidad. También, tras eliminar el edrofonio por diálisis, se incuba la AChE, que previamente se ha tratado con FA, con PKA (Apdo. V.2.2).

2.5. Medida de la actividad fosfatasa alcalina en espectrofotómetro

La actividad FA se mide de acuerdo con el Dr. Mössner y col. (1980), empleando como sustrato de la enzima el *p*-nitrofenilfosfato (pNPP) a una concentración 10 mM, en un medio con 0,5 mM MgCl₂ y tampón dietanolamina 1 M, pH 9,8. Para ello, se prepara una disolución 4 M de dietanolamina, pH 9,8, y otras dos de pNPP 40 mM y MgCl₂ 0,2 M. De las disoluciones de partida se deposita el volumen necesario en una cubeta de plástico de 1,5 ml, junto con 20 µl de la muestra de enzima, para conseguir las concentraciones finales en un volumen de 1 ml (que se completa con agua).

Dado que la FA es una metaloproteína, la dietanolamina actúa como un activador de la enzima al modificar el entorno del centro activo con Zn (Mössner y col., 1980). Para conseguir una actividad constante e independiente del tampón, es conveniente incubar la FA 30 min con la dietanolamina y el MgCl_2 , antes de añadir el sustrato a la cubeta. La FA requiere Mg^{+2} en los medios de reacción para expresar correctamente su actividad. Por tanto, las diluciones de la enzima siempre deben hacerse en un tampón con la sal de magnesio. Se deposita el pNPP en la cubeta y se mide el incremento de absorbancia a 405 nm ($\epsilon = 18,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), a 25°C, en un espectrofotómetro (Kontron, Uvikon 930). La absorbancia se debe al *p*-nitrofenol, que se origina por la hidrólisis enzimática del pNPP. Un cubeta "blanco" con todos los reactivos, pero sin la muestra, resta la absorbancia no específica.

Para obtener la actividad FA expresada en μmoles de sustrato hidrolizados por min y por ml de muestra, el incremento de absorbancia/min se multiplica por el factor de 2,75. Para un paso óptico de 1 cm, dicho factor resulta de la expresión del Apartado II.2.3.1, donde $\epsilon_{405} = 18,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $V_t = 1 \text{ ml}$ y $V_m = 0,02 \text{ ml}$. Una unidad de actividad es la cantidad de enzima que hidroliza 1 μmol de pNPP por min a 25°C.

2.6. Electroforesis desnaturalizante en gradiente de poliacrilamida.

Autorradiografía de los geles

La AChE tratada con PKA, en presencia de $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$, se somete a electroforesis desnaturalizante y posterior autorradiografía, para investigar la posible incorporación de fósforo radiactivo a la enzima. También se analiza por electroforesis la AChE incubada con FA, tiñéndose los geles con azul de Coomassie, para comprobar si el tratamiento con la fosfatasa modifica la migración electroforética de la AChE.

La electroforesis se realiza siguiendo el método de Laemmli (1970), con un sistema discontinuo de tampones, y utilizando un sistema electroforético como el de Pharmacia-LKB, con el que se consiguen geles de $\sim 15 \times 14 \times 0,2 \text{ cm}$.

Básicamente, se siguen los pasos descritos en el Apartado II.2.4 (electroforesis no desnaturizante en gradiente de poliacrilamida), pero con las modificaciones que se exponen a continuación:

-Al tratarse de una electroforesis en condiciones desnaturizantes, todos los medios contienen SDS: al 0,1% (p/v) en el gel separador y espaciador y en el tampón de recorrido, y al 2% (p/v) en la disolución utilizada para desnaturizar las muestras antes de aplicarlas a las calles del gel. La desnaturización se completa calentando las muestras 5 min a 80°C en dicha disolución, que también contiene β -ME al 5% (p/p).

-Si no se especifica lo contrario, se prepara el gel separador con un gradiente lineal de poliacrilamida del 5 al 15% (p/v).

-La mezcla de proteínas estándares contiene: aprotinina de páncreas bovino (6,5 kDa), lisozima de huevo de gallina (14,4 kDa), inhibidor de tripsina (21,5 kDa), anhidrasa carbónica bovina (31 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), albúmina de suero bovino (66 kDa), fosforilasa b de músculo de conejo (subunidad, 97,4 kDa), β -galactosidasa de *Escherichia coli* (subunidad, 116 kDa) y miosina de músculo de conejo (subunidad, 200 kDa).

-La electroforesis se desarrolla a voltaje constante (70 voltios) durante 17-20 h. Un sistema de refrigeración continua impide el calentamiento.

Finalizada la electroforesis, el gel se sumerge por 1,5 h en una disolución con metanol al 7% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v), para fijar las proteínas. Se realiza un cambio de la disolución fijadora, manteniendo el gel sumergido 30 min más y, por último, se lava con agua otros 30 min. El proceso electroforético separa el ATP radiactivo libre del incorporado a la proteína; en consecuencia, tanto el tampón de recorrido como las disoluciones de fijación y lavado se contaminan con ^{33}P , por lo que deben almacenarse en lugar seguro hasta la pérdida total de radiactividad.

Una vez fijadas las proteínas, el gel se incluye entre dos capas de plástico, que se sellan perfectamente, y se coloca sobre una pantalla ultrasensible a la radiación emitida por el ^{33}P ("Imaging Screen", Specification: HS-High Screen for ^{33}P). La pantalla con el gel adherido se introduce en un escáner conectado a un ordenador. Después de 24-48 h, el escáner recoge la imagen impresa en la pantalla y la envía al ordenador. Tras la autorradiografía, el gel se despegue de la pantalla, se saca de la bolsa de plástico y se tiñe con azul de Coomassie (Apdo. II.2.4.4).

2.7. Isoelectroenfoque

Se investiga por isoelectroenfoque si la acción de la FA sobre la AChE aumenta su punto isoelectrónico, lo cual indicaría que la fosfatasa separa grupos fosfato (con cargas negativas) de la molécula de AChE.

En el isoelectroenfoque, las proteínas se someten a electroforesis a través de un gel con un gradiente estable de pH, de forma que éste aumenta suavemente del ánodo al cátodo. Cada proteína migrará hasta la posición del gradiente de pH que corresponda a su punto isoelectrónico, y aparecerá "enfocada" en una banda muy estrecha, cuyo grosor puede ocupar 0,01 unidades de pH, lo que significa que basta una sola carga neta para separar dos proteínas.

Se emplea un sistema electroforético de tamaño reducido (Mini-Protean II, Bio-Rad). El gel resultante presenta una superficie de 7x8 cm y un grosor de 0,75 mm.

2.7.1. Preparación del gel

El gel, con una concentración de acrilamida del 5% (p/v), se prepara de acuerdo con Robertson y col. (1987). Para un volumen de 12 ml se mezclan:

Agua bidestilada	5,4 ml
Acrilamida 29,2%-bisacrilamida 0,8%	2,0 ml
Disolución de anfolitos, pH 3-10 (Fluka)	288 µl
Urea ultrapura	6,0 g
Persulfato amónico 10% (p/v)	25 µl
TEMED (Bio-Rad)	20 µl

La urea es un agente desnaturizante que, a diferencia del SDS, no posee carga y, por tanto, no afecta a la de las proteínas. La presencia de urea en el medio elimina las interacciones proteína-proteína y proteína-lípido, que podrían modificar la carga neta y, en consecuencia, el punto isoeléctrico de la muestra. La disolución de anfolitos contiene una mezcla de oligómeros, de masa molecular baja (300-900 daltones) y con diferentes valores de punto isoeléctrico, que llevan unidos grupos amino alifáticos y otros de ácido carboxílico (Rigghetti, 1989). La acción del campo eléctrico sobre los anfolitos genera el gradiente de pH (Apdo. V.2.7.3), pero es la capacidad tamponadora de éstos la que mantiene estable dicho gradiente durante todo el proceso. En teoría, una mezcla de anfolitos con puntos isoeléctricos comprendidos entre 3 y 10 genera un gradiente de pH entre estos valores (Giulian y col., 1984); sin embargo, en la práctica obtenemos geles en los que el pH aumenta de 4 a 8.

En primer lugar, se montan los cristales entre los que va a polimerizar el gel. Sólo entonces, se mezclan sin agitación vigorosa en un vaso de precipitados la urea, el agua, la disolución de acrilamida-bisacrilamida y la de anfolitos. La urea se disuelve más rápido si se calienta un poco la mezcla. Una vez disuelto el agente desnaturizante, se añade el persulfato y el TEMED, se agita todo y se vierte entre los cristales, hasta el límite superior y sin formar burbujas de aire. Se coloca con cuidado el peine formador de las calles y se deja polimerizar a temperatura ambiente (~ 1 h). Concluida la polimerización, se retira el peine y se lavan las calles con agua.

2.7.2. Tratamiento de las muestras

Para un volumen de 5 ml, se prepara una disolución desnaturalizante como sigue (Robertson y col., 1987):

Agua bidestilada	1,7 ml
Urea ultrapura	2,4 g
Disolución de anfolitos, pH 3-10 (Fluka)	120 μ l
Triton X-100 20% (p/v)	500 μ l
β -mercaptoetanol 98% (p/p) (Acros)	50 μ l
Azul de bromofenol al 1% (p/v)	200 μ l

La concentración final de urea en la mezcla desnaturalizante es de 8 M, mientras que el β -ME se encuentra al 1% (p/p). El detergente no iónico Triton X-100 se utiliza para mejorar la resolución de las bandas en el gel, porque ayuda a prevenir la agregación de las proteínas de membrana.

La muestra se diluye dos veces en la disolución con urea (concentración final, 4 M) y β -ME (al 0,5% p/p en la muestra), y la desnaturalización de las proteínas se completa calentando 5 min a 95°C. Después de la incubación, y antes de aplicar las muestras al gel, éstas se centrifugan 5 min a 13.000 rpm, para eliminar los agregados proteicos que, en caso contrario, "rayarían" el gel durante la electroforesis (Sinclair y Rickwood, 1981).

2.7.3. Generación del gradiente de pH, aplicación de las muestras y recorrido

Los cristales con el gel polimerizado se colocan en el sistema de electroforesis, y así se forma el depósito superior, que se sella con silicona. Este depósito debe quedar perfectamente estanco, de tal modo que no haya pérdidas de líquido hacia el inferior. Los depósitos superior (del cátodo) e inferior (del ánodo) se llenan, respectivamente, con NaOH 20 mM y H₃PO₄ 10 mM (O'Farrell, 1975). Las disoluciones se preparan, justo antes de utilizarlas, a partir de NaOH 1 M y H₃PO₄ 1 M (Pollard, 1984). Se trabaja a temperatura ambiente para prevenir que la urea cristalice.

El gradiente de pH del gel se consigue sometiendo a electroforesis previa (30 min a un voltaje constante de 150 voltios) la mezcla de anfolitos, cuando todavía no se han depositado las muestras en las calles (Robertson y col., 1987). Bajo la influencia del campo eléctrico, los anfolitos se distribuyen de acuerdo con sus puntos isoelectrónicos, de manera que los más ácidos se escalonan desde el ánodo, mientras que los más básicos lo hacen desde el cátodo.

Después de generar el gradiente de pH, se desconectan los electrodos y se aplican las muestras en las calles. Debido a que las muestras de AChE se diluyen mucho al tratarlas con FA y pasarlas por la columna cromatográfica (Apdo. V.2.4), la capacidad de los pocillos (50 μ l) es insuficiente para depositar una cantidad de proteína que se pueda detectar con Coomassie. Por ello, durante la preparación del gel no se utiliza el peine formador de calles del Mini-Protean II, sino que con un formador diseñado por nosotros se logran pocillos de mayor capacidad (hasta 250 μ l), que permiten aplicar unos 3 μ g de proteína (AChE)/calle, cantidad que al concentrarse en una banda muy estrecha se puede observar al teñir el gel con el azul de Coomassie.

Una vez depositadas las muestras, la electroforesis se desarrolla a voltaje constante (200 voltios) por 2,5 h, a temperatura ambiente (Robertson y col., 1987). A lo largo de la electroforesis, la temperatura no sobrepasa los 40-50°C en el sistema electroforético.

2.7.4. Medida del gradiente de pH y detección de las proteínas en el gel

Finalizada la electroforesis, se desmonta el sistema y se saca el gel de entre los cristales. Antes de sumergirlo en la disolución fijadora, se corta una tira (de arriba a abajo) del gel. Ésta, a su vez, se divide en unos 15 trozos de 0,5 cm, cada uno de los cuales se deposita en un tubo numerado que contiene 1 ml de KCl 10 mM. Después de 30 min (mínimo), se mide el pH en los tubos. Se representan los valores de pH frente a las distancias relativas (esto es, referidas a la longitud total del gel), obteniéndose la recta de calibrado.

Mientras tanto, para fijar las proteínas, el gel se sumerge en una disolución de ácido tricloroacético al 10% (p/v) durante 10 min y, a continuación, 2 h en ácido tricloroacético al 1% (p/v) (Robertson y col., 1987). Después, se lava 15 min con SDS al 0,25% (p/v) en etanol:ácido acético:agua (33:10:57). El SDS se une a los anfólitos y contribuye a eliminarlos del gel (Giulian y col., 1984), evitando que interfieran con la tinción de las proteínas. Por último, el gel se tiñe 1 h con azul de Coomassie (Apdo. II.2.4.4).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.2. La proteína quinasa A no fosforila la AChE de eritrocito humano o bovino

Según los resultados del grupo de la Dra. Soreq (Apdo. V.1.1), la PKA fosforila la AChE, con lo que aumenta la actividad enzimática. Este fenómeno ocurre con la AChE de distintos orígenes; por ejemplo, con la enzima purificada de eritrocito humano o bovino, que les suministró el Prof. Brodbeck para los experimentos de fosforilación.

En base a estos resultados, nos propusimos localizar y analizar *in vitro* los sitios de fosforilación en la molécula de AChE de eritrocito humano y bovino, empleando para ello muestras de la enzima también purificada en el laboratorio del Dr. Brodbeck. En principio, supusimos que la fosforilación tenía lugar en secuencias no consenso (Grifman y col., 1997).

Para alcanzar los objetivos propuestos, nuestro plan de trabajo consistía en incubar la AChE con PKA, en presencia de $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$. La AChE marcada se trataría con bromuro de cianógeno, para que el ataque selectivo de este reactivo a los restos de metionina (Gross, 1967) rompiera la proteína, generando péptidos de distinta masa molecular. Los péptidos se aislarían por tricina SDS-PAGE (Schägger y von Jagow, 1987), un método electroforético que permite separar proteínas cuyas masas moleculares estén comprendidas entre 1 y 100 kDa. El gel resultante se sometería a autorradiografía, para localizar los péptidos con la señal radiactiva. Los péptidos marcados se transferirían a una membrana de nitrocelulosa y, por último, se analizaría la secuencia de aminoácidos de cada uno de ellos (sobre el análisis de los sitios de fosforilación consultar, por ejemplo, Hardie y col., 1993).

En primer lugar, para verificar que la fosforilación ocurría realmente, la AChE de EB se incubó con PKA y $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ como se describe en el Apartado

V.2.2. Después de la incubación, la muestra se sometió a electroforesis desnaturalizante. La autorradiografía reveló una única banda radiactiva de 46 ± 4 kDa ($n=5$) (**Fig. V.1a**), mientras que al teñir posteriormente el gel con azul de Coomassie se apreció, junto a la banda de 46 kDa, una de 81 ± 2 kDa ($n=4$) y otra más tenue de 149 ± 3 kDa ($n=4$) (**Fig. V.1**, calle **A**). La calle **B** del gel de la **Figura V.1** corresponde a la AChE incubada sin PKA (control). En esta calle sólo se observan las proteínas de 81 kDa y 149 kDa, indicando, sin ningún género de dudas, que la de 46 kDa de la calle **A** pertenece a la subunidad catalítica (C) de la PKA. Además, el valor de 46 kDa coincide con el calculado previamente por otros autores para la masa molecular de la subunidad C de la PKA (Bossemeyer y col., 1996). A partir de los resultados es posible concluir que la quinasa se autofosforila en ausencia de un sustrato adecuado, puesto que sólo la proteína de 46 kDa incorporó fósforo radiactivo. Las proteínas de 81 kDa y 149 kDa, que no dieron señal radiactiva, corresponden al monómero y al dímero de la AChE de EB, respectivamente; por tanto, una fracción de la enzima conservó el estado de agregación dimérico de la proteína nativa, a pesar del tratamiento disociante con SDS y β -ME. Los valores de 81 kDa y 149 kDa son idénticos a los obtenidos para las respectivas formas moleculares generadas a partir de la AChE de SFB (Apdo. III.3.1).

Los mismos resultados se obtuvieron cuando la AChE de EH se trató con PKA, en presencia de [γ - ^{33}P]-ATP, y se sometió a SDS-PAGE. La quinasa se autofosforiló (única proteína que incorporó ^{33}P), pero no transfirió ningún grupo fosfato a la molécula de AChE de origen humano. La **Figura V.2** muestra el gel teñido con Coomassie correspondiente a la AChE de EH incubada con (calle **A**) o sin PKA (calle **B**). En la calle **A** se aprecian dos bandas: una de 75 ± 1 kDa ($n=3$), que pertenece a la forma molecular G_1 de AChE de EH, y la de 46 kDa de la subunidad catalítica de la PKA. Como era de esperar, en la calle **B** sólo se observa la proteína de 75 kDa. En esta ocasión, el tratamiento con SDS y β -ME fue suficiente para monomerizar por completo la forma G_2 de AChE. La diferencia entre la masa molecular de la subunidad catalítica de la AChE de EB

Fig. V.1b

Fig. V.1a

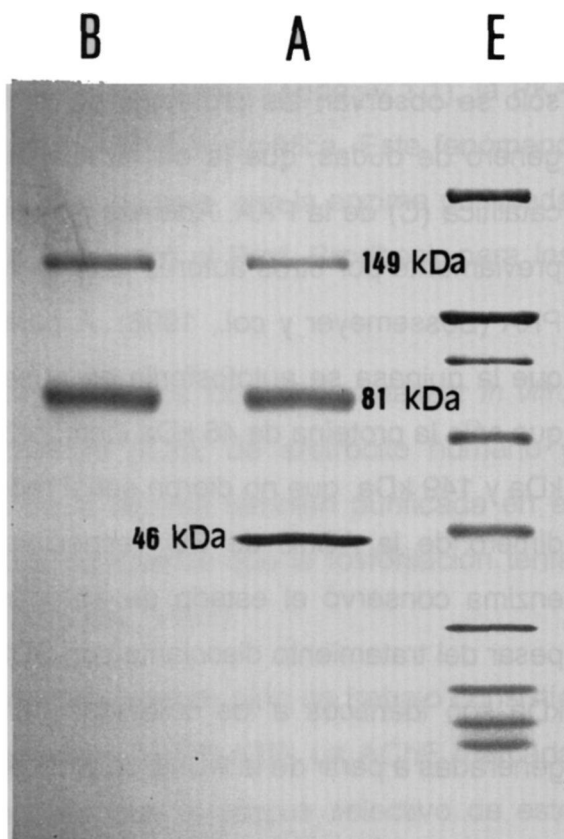
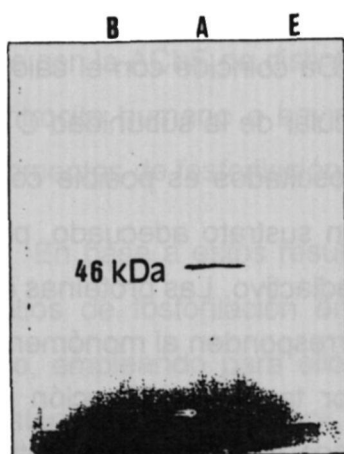


Figura V.1. Electroforesis desnaturalizante de la AChE de EB incubada con PKA. La AChE purificada de EB (~ 5 μ g) se trató con 150 unidades de PKA, en un medio con MgCl_2 18 mM, Triton X-100 al 0,1% (p/v), ATP 0,2 mM, $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ (5.500 cpm/pmol), Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Tras la incubación, la muestra se desnaturalizó con SDS al 2% (p/v) y $\beta\text{-ME}$ al 5% (p/p), y se sometió a SDS-PAGE en un gel con gradiente de poliacrilamida (5-15% p/v). La electroforesis se desarrolló a 70 V durante 17 h. La autorradiografía del gel (Fig. V.1a, 24 h de exposición) reveló que sólo la proteína de 46 kDa (subunidad catalítica de la PKA) incorporaba ^{33}P . Obsérvese el $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ en el frente del gel. Al teñir con Coomassie (Fig. V.1b) se detectaron en la calle A, además de la banda de 46 kDa, otras dos de 81 kDa y 149 kDa (monómero y dímero de la AChE de EB, respectivamente). Calle B, control sin PKA. Los estándares (calle E) fueron: miosina (200 kDa), β -galactosidasa (116 kDa), fosforilasa b (97,4 kDa), albúmina de suero bovino (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsina (21,5 kDa), lisozima (14,4 kDa) y aprotinina (6,5 kDa).

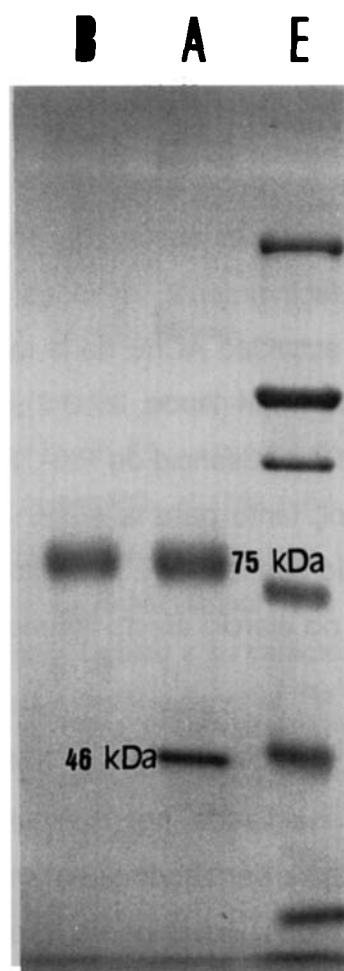


Figura V.2. Electroforesis desnaturizante de la AChE de EH tratada con PKA. Se investigó la capacidad de la PKA para transferir grupos fosfato a la AChE. Las muestras de AChE purificada de EH (~ 5,5 µg) se incubaron, en presencia de $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$, con (calle **A**) o sin (calle **B**) PKA (Apdo. V.2.2), y se depositaron en un gel de poliacrilamida. Las condiciones de la electroforesis como en la Figura V.1, pero en esta ocasión el gel contiene una concentración fija (8% p/v) de acrilamida. Tras teñir con Coomassie se observó una proteína de 75 kDa (calles **A** y **B**), que representa el monómero de la AChE de EH. La banda de 46 kDa (calle **A**) corresponde a la subunidad catalítica de la PKA. La autorradiografía (no mostrada) reveló que la PKA no transfería ^{33}P a la AChE. Las proteínas estándares (calle **E**) como en la Figura V.1, exceptuando las de menor masa molecular (inhibidor de tripsina, lisozima y aprotinina), que se perdieron por la parte baja del gel.

(81 kDa) y la de EH (75 kDa) se debe a los restos de oligosacáridos unidos a una u otra molécula (Liao y col., 1992). De hecho, la AChE bovina posee 5 sitios potenciales de N-glicosilación (Doctor y col., 1990) frente a los 3 de la enzima humana (Soreq y col., 1990).

Los experimentos anteriores demuestran de manera directa que la PKA no fosforila la AChE de eritrocito bovino o humano, y, por consiguiente, la incubación con la quinasa no debe modificar la capacidad de la AChE para hidrolizar la ACh, en contra de lo observado por el grupo de la Dra. Soreq (Grifman y col., 1997). Efectivamente, después del tratamiento con la PKA (Apdo. V.2.2), se midió la actividad AChE de la muestra (prueba) en un medio con DTNB 0,33 mM y ATCh 1 mM (Apdo. II.2.3.2), y se comparó dicha actividad con la del control incubado en ausencia de PKA, no encontrándose diferencias entre la prueba y el control, tanto para la AChE de EB como para la de EH. Cuando el ensayo se repitió con la AChE purificada de SFB se obtuvo idéntico resultado, esto es, la PKA no ejerció efecto alguno sobre la actividad hidrolítica de la AChE.

Podría ocurrir, no obstante, que la PKA de Promega con la que trabajábamos se hubiera inactivado por cualquier motivo (lote defectuoso, deficiencias en el transporte,...), perdiendo la enzima la capacidad para fosforilar sus sustratos. Aunque esta posibilidad parecía remota, ya que la PKA sufría autofosforilación, decidimos descartarla definitivamente. Para ello, se realizó el ensayo descrito en el Apartado V.2.3, en el que se empleó un sustrato adecuado de la enzima, el kemptide. Cuando se trató con PKA en presencia $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$, el kemptide incorporó de manera efectiva fósforo radiactivo, como se muestra en la **Tabla V.1**.

Tabla V.1. Ensayo de actividad PKA por medida de ^{33}P incorporado a kemptide

<u>Muestra</u>	<u>Radiactividad (cpm)</u>
1 (+PKA)	263.097
1' (+PKA)	270.377
2 (-PKA)	3.752
2' (-PKA)	3.322

Una disolución de MgCl_2 14 mM, kemptide 0,1 mM, ATP 0,2 mM y $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ (220 cpm/pmol) en Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, se incubó con (1 y 1') o sin (2 y 2') 60 U de PKA. La incubación se detuvo con H_3PO_4 al 10% (v/v), y la mezcla de cada vial se aplicó a un trocito numerado de papel de fosfocelulosa. Una vez secos, los papeles se lavaron con H_3PO_4 al 0,5% (v/v). La radiactividad fijada a los papeles se midió en un contador de centelleo líquido (cpm). Debido a su carácter básico el kemptide se unió a la fosfocelulosa, propiedad que permitió separar el ^{33}P incorporado al péptido por la acción de la quinasa del ATP radiactivo libre, que se eliminaba en los lavados.

Por tanto, la PKA catalizaba correctamente la transferencia del grupo fosfato a un sustrato óptimo, pero no así a la AChE.

En el ensayo de la **Tabla V.1**, la radiactividad (cpm) de los blancos (viales 2 y 2') representa aproximadamente el 1% de las cpm unidas a la fosfocelulosa en las muestras tratadas con PKA (viales 1 y 1'). Si bien en este tipo de ensayos dicho porcentaje se espera que sea del 0,1% o menor, puede alcanzar algo más del 1% por la presencia en el $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ comercial de ^{33}P contaminante, que posee una carga positiva neta en medio ácido, la cual interacciona con las cargas negativas de la fosfocelulosa (Casnellie, 1991). Además, la PKA puede actuar como una ATPasa, hidrolizando, aunque muy lentamente, el $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ y liberando una pequeña cantidad de ^{33}P (Bossemeyer y col., 1996).

De los experimentos expuestos en este apartado se concluye que la PKA no fosforila la AChE de distintos orígenes, en contradicción con los resultados obtenidos por la Dra. Grifman y col. (1997). Esta discrepancia resulta tanto más sorprendente si se tiene en cuenta que en los dos centros de investigación se emplearon muestras de AChE de eritrocito humano o bovino suministradas por el mismo laboratorio, en donde la enzima se purificó mediante el mismo procedimiento (Brodbeck y col., 1981).

3.2. La proteína quinasa A tampoco fosforila la AChE de eritrocito humano preincubada con fosfatasa alcalina

Para intentar conciliar los resultados del grupo de la Dra. Soreq con los nuestros, aventuramos una última hipótesis según la cual la AChE ya estaría completamente fosforilada antes de incubarla *in vitro* con la PKA. En realidad, la hipótesis surgió necesariamente de la atenta lectura del trabajo de la Dra. Grifman y col. (1997).

En base a la modificación del punto isoeléctrico de una pequeña fracción de la AChE por la acción de la FA, estos investigadores argumentaban que dicha porción de la enzima había adquirido los grupos fosfato *in vivo*, manteniéndose ligados a la molécula de proteína durante el proceso de purificación. Al desprender algunos de los grupos fosfato *in vitro*, la FA disminuía las cargas negativas de la AChE, aumentando, por tanto, su punto isoeléctrico. El isoelectroenfoque, que permite separar proteínas que difieren en una sola carga neta (Apdo. V.2.7), sirvió para investigar la posible pérdida de grupos fosfato en la AChE. El isoelectroenfoque se realizó en condiciones no desnaturizantes y el gel se tiñó para revelar la actividad AChE. Menos de un 3% de la actividad total correspondía a la nueva banda de mayor punto isoeléctrico, lo cual podía indicar que la AChE desfosforilada se inactivaba parcialmente. Por otra parte, tras el tratamiento con la fosfatasa, la Dra. Grifman y col. observaron que una fracción (en esta ocasión, más relevante) de la AChE migraba más rápido en geles de SDS-PAGE, a pesar de la dificultad que

supone, desde nuestro punto de vista, separar por electroforesis normal los distintos estados de fosforilación de una proteína.

Si nuestra hipótesis resultara cierta, es decir, si la AChE de eritrocito humano o bovino utilizada en nuestros experimentos se encontrara en un estado completamente fosforilado, ello explicaría la incapacidad de la PKA para transferirle algún otro grupo fosfato. El grupo de la Dra. Soreq habría trabajado con muestras de AChE sólo parcialmente fosforilada, todavía susceptible a la acción de la quinasa. Las diferencias en el grado de fosforilación de la AChE vendrían ya determinadas en el material de partida (sangre humana o bovina), puesto que no se deben al empleo de distintos protocolos de purificación de la enzima. Así, durante la purificación de la AChE de eritrocito humano o bovino en el laboratorio del Dr. Brodbeck, todos los medios contenían EDTA a una concentración suficiente (> 5 mM) para prevenir la actividad quinasa (Brodbeck y col., 1981). Al secuestrar los cationes divalentes, el EDTA actúa como un inhibidor de las proteínas quinasas, ya que todas estas enzimas sólo reconocen el ATP asociado con el Mg^{+2} (Hardie y col., 1993). Una vez eluida de la columna de afinidad la AChE, el EDTA se eliminaba por diálisis.

Para aceptar o rechazar la hipótesis de la completa fosforilación, la AChE de EH se incubó con FA (Apdo. V.2.4). La AChE tratada con la fosfatasa no experimentó variación en su capacidad para hidrolizar la ATCh. Tras la incubación, las dos enzimas se separaron por cromatografía de afinidad en una columna de Edf-esp-sepharose. Mientras que más del 80% de la actividad fosfatasa depositada en la columna eluyó libremente, prácticamente el 100% de la actividad AChE se unió a la matriz. Después de lavar el gel, cerca del 50% de la AChE fijada se desprendió con edrofonio 10 mM disuelto en tampón Tris salino. En la **Figura V.3** se representa el perfil de elución de ambas enzimas.

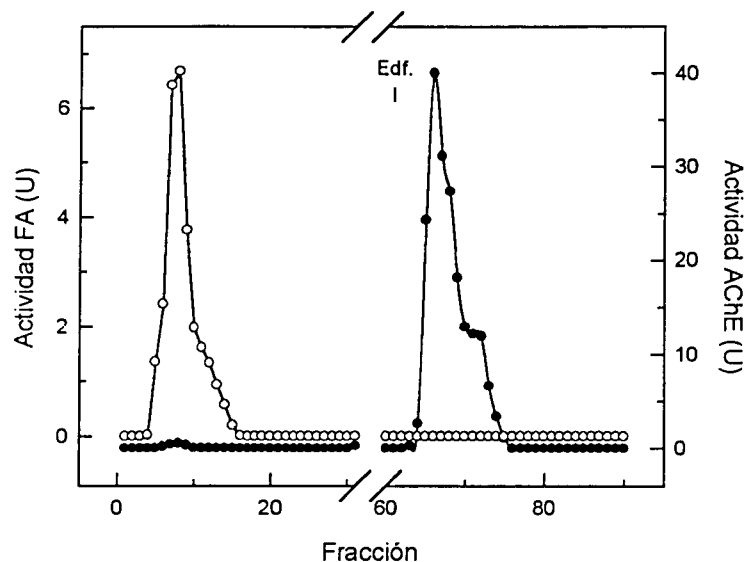


Figura V.3. Cromatografía de afinidad en columna de Edf-esp-sepharose para separar la AChE de la FA. La AChE purificada de EH (400 U; 1 U = 1 μ mol/min) se incubó con 40 U de actividad FA en tampón Tris salino, pH 8,5. La mezcla se pasó por una columna de Edf-esp-sepharose. La FA eluyó con tampón Tris salino, pH 7,4 (fracciones 1-30), a la vez que la AChE se fijó a la matriz. Tras lavar con NaCl 0,5 M (fracciones 31-60), la AChE se liberó de la columna con edrofonio 10 mM, en tampón Tris salino, pH 7,4 (fracciones 61-90). Se recogieron fracciones de ~ 100 μ l, en las que se valoró la actividad AChE (●) y FA (○).

La AChE desprendida de la matriz de Edf-esp-sepharose se sometió a SDS-PAGE, para conocer si el tratamiento con la FA había modificado su migración electroforética. Una muestra de AChE no incubada con FA sirvió como control. La tinción con Coomassie reveló una única banda de proteína de

75 kDa, que corresponde a la subunidad catalítica de la AChE de EH, tanto en la muestra tratada con fosfatasa como en el control (calles **A** y **B**, respectivamente, del gel de la **Fig. V.4**). El resultado demostraba que la migración electroforética de la proteína permanecía inalterada. La ausencia en la calle **A** de una banda en la posición de la FA (~ 65 kDa) confirmó la correcta separación de ambas enzimas (AChE y FA) por cromatografía de afinidad.

La AChE eluida de la columna de Edf-esp-sepharose también se sometió a isoelectroenfoque (Apdo. V.2.7). El punto isoeléctrico de la AChE incubada con FA aumentó ligeramente respecto al de la no tratada, $6,25 \pm 0,09$ ($n=2$) frente a $6,16 \pm 0,14$ ($n=2$) (**Fig. V.5**). No obstante, el incremento observado no fue significativo (al considerar las desviaciones estándar de los valores) para servir de prueba demostrativa de la pérdida de grupos fosfato por acción de la fosfatasa. En el trabajo de la Dra. Grifman y col. (1997), el punto isoeléctrico de la AChE “desfosforilada” experimentaba una variación suficientemente significativa.

Así pues, no obtuvimos prueba alguna que permitiera verificar la hipótesis de la completa fosforilación de la AChE *in vivo*. Finalmente, el siguiente experimento nos llevó a rechazarla definitivamente.

La AChE de EH se incubó con FA, se pasó por una matriz de Edf-esp-sepharose y, por último, se trató con PKA (Apdo. V.2.2). Por un lado, la quinasa no ejerció ningún efecto sobre la actividad AChE de la muestra y, por otro, cuando la incubación tenía lugar en presencia de $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$, la PKA no incorporó fósforo radiactivo a la molécula de AChE (**Fig. V.6**). Los resultados demostraron que la PKA no fosforilaba la AChE *in vitro*, aunque ésta previamente se hubiera tratado con FA.

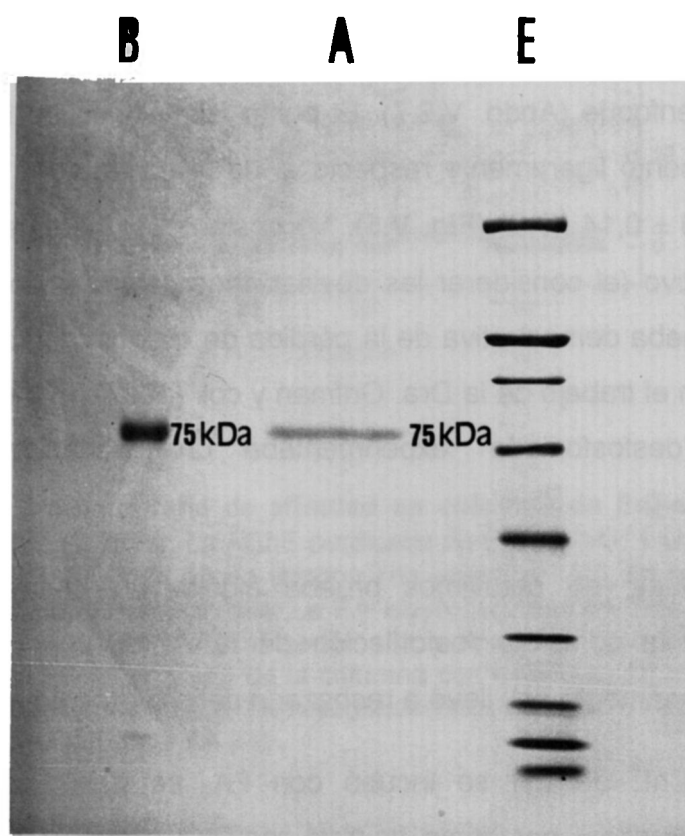


Figura V.4. Electroforesis desnaturalizante de la AChE de EH tratada con FA. Tinción de Coomassie. La AChE purificada de EH se incubó con FA y se pasó por una matriz de Edf-esp-sepharose para eliminar la actividad fosfatasa. La AChE ($\sim 3 \mu\text{g}$) libre de la FA se sometió a SDS-PAGE bajo las condiciones descritas en la Figura V.1. Se observó una sola banda de proteína (calle A), cuya masa molecular (75 kDa) coincidía con la de la subunidad de AChE no tratada antes con FA (calle B, control). Los estándares (calle E) como en la Figura V.1.

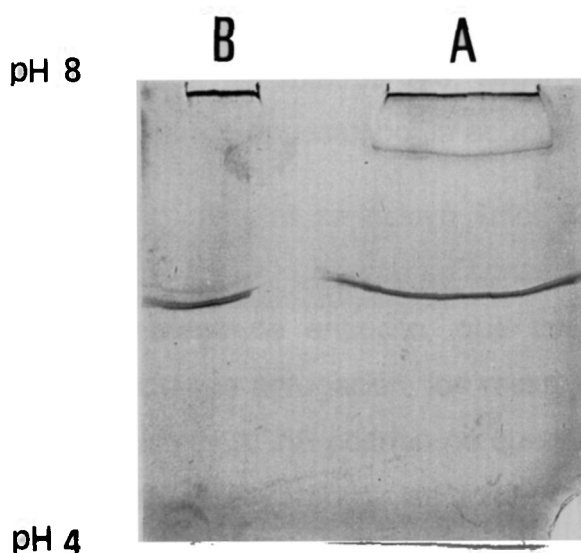


Figura V.5. Isoelectroenfoque de la AChE de EH tratada con FA. Tinción de Coomassie. La AChE se incubó con FA y, después, la fosfatasa se eliminó por cromatografía de afinidad. Mediante isoelectroenfoque se investigó si el punto isoeléctrico de la AChE cambiaba por la acción de la fosfatasa. Para ello, la AChE (~ 3 μ g) tratada (calle **A**) o no (calle **B**, control) con FA se sometió a electroforesis desnaturizante, en un gradiente de pH (4-8), en un gel con urea pero sin SDS. La electroforesis se desarrolló durante 2,5 horas a 200 V. El gradiente de pH se midió como se indica en el Apartado V.2.7.4. El pequeño incremento del punto isoeléctrico de la AChE preincubada con FA no es significativo.

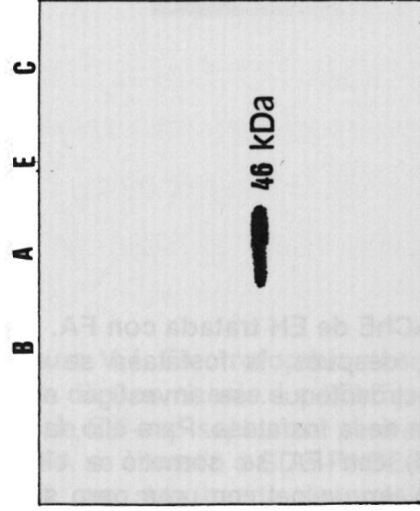


Fig. V.6a

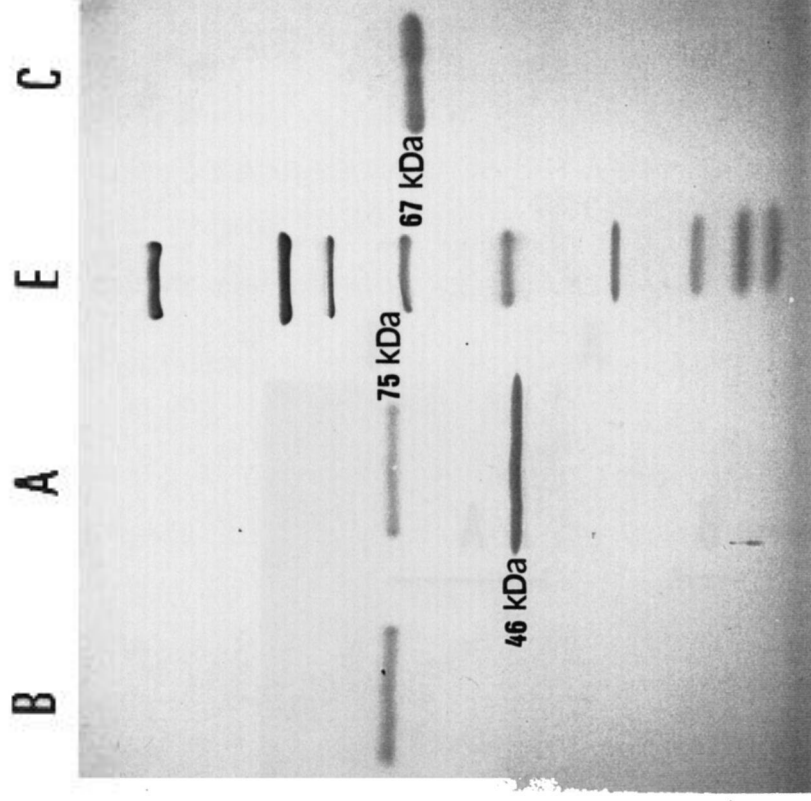


Fig. V.6b

Figura V.6. Electroforesis desnaturalizante de la AChE de EH incubada con FA y, tras eliminar la fosfatasa, con PKA y $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$. Tras los sucesivos tratamientos, la AChE de EH ($\sim 3 \mu\text{g}$) se sometió a SDS-PAGE, como en la Figura V.1, sólo que la electroforesis se desarrolló por más tiempo ($\sim 20 \text{ h}$), para eliminar completamente el ATP radiactivo. La autorradiografía del gel (Fig. V.6a, 48 h de exposición) mostró que sólo la subunidad catalítica de la PKA (banda de 46 kDa, calle A) incorporaba ^{33}P . Al teñir con azul de Coomassie, también se observó el monómero de AChE de EH (proteína de 75 kDa) en las calles A y B (esta última era el control de AChE incubada sin PKA). En la calle C se depositaron 20 unidades ($\sim 10 \mu\text{g}$) de FA purificada de intestino de ternero (Boehringer Mannheim), que es la banda de 67 kDa. La ausencia de esta banda en las calles A y B demostró que las dos enzimas (la AChE y la fosfatasa) se habían separado tras la cromatografía de afinidad. Los estándares (calle E) como en la Figura V.1.

Por consiguiente, nuestros resultados se contradicen por completo con los del grupo de la Dra. Soreq, sin que acertemos a conocer la causa de tal discrepancia. No obstante, parece claro que la AChE no constituye un sustrato especialmente óptimo de la PKA, pues, según la propia opinión de la Dra. Grifman y col. (1997), su capacidad para aceptar los grupos fosfato es limitada en comparación con la de otros sustratos bien estudiados de la quinasa, como las histonas. Por otra parte, hemos observado algunas contradicciones en los resultados del citado grupo de investigación. Por ejemplo, afirman que la PKA fosforila la AChE, ya que le transfiere ^{33}P , pero a la vez no demuestran que la acción de la quinasa disminuya el punto isoelectrico y la migración electroforética de la AChE, parámetros que, según los mismos autores, sí se modifican, aunque en sentido opuesto, por la acción de la FA.

En nuestros experimentos se incluyó Triton X-100 al 0,1% (p/v) en los medios de incubación con PKA. Con ello se conseguía evitar la agregación de la AChE de la membrana de eritrocito, que posee un marcado carácter hidrofóbico. De producirse la agregación, los restos de serina o treonina en la superficie de la molécula de AChE podrían no quedar accesibles a la acción de la quinasa. No obstante, para reproducir las condiciones del protocolo empleado por la Dra. Grifman y col. (1997), en experimentos preliminares se incubó la AChE con PKA en ausencia del detergente, y tampoco se obtuvieron resultados satisfactorios.

Según nuestro criterio, el método de fosforilación publicado por la Dra. Grifman es inadecuado, no sólo por la falta de Triton X-100 en el medio de reacción, sino principalmente por la presencia de EDTA a una concentración 50 mM, cuando, en general, una concentración 5 mM de EDTA es suficiente para complejar todos los cationes divalentes y, por tanto, prevenir la actividad quinasa (Hardie y col., 1993). Antes de que la Dra. Soreq publicara los resultados de su grupo, le comunicamos nuestra observación sobre el EDTA. La investigadora contestó que compartía dicha opinión, pues, de hecho, habían obtenido mejores resultados al eliminar el EDTA del medio de incubación. Además, nos proporcionó un nuevo protocolo en el que se prescindía del

agente “quelante” y se aumentaba tanto la concentración de $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ como las unidades de PKA. Ese nuevo protocolo con algunas modificaciones (por ejemplo, la inclusión de Triton X-100) fue el que finalmente empleamos en nuestros experimentos (Apdo. V.2.2), con los resultados ya indicados.

Con todo, en trabajos sucesivos, intentaremos probar la acción de la fosfatasa alcalina sobre las muestras de AChE purificada de SFB y el efecto posterior de la PKA.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La AChE de suero fetal bovino (SFB) se purifica unas 90.000 veces por cromatografía de afinidad en matriz de Edf-agarosa. La facilidad de preparación de la matriz, la relativa simplicidad del proceso cromatográfico, el grado de purificación de la enzima y el aceptable rendimiento de proteína aconsejan este método cuando se desee purificar las formas plenamente hidrofílicas de AChE de cualquier tejido o medio biológico.

2. La enzima purificada de SFB presenta verdadera actividad AChE. No se trata, por tanto, de una BuChE sérica, sino de una forma molecular tetramérica e hidrofílica de AChE (moléculas G_4^S). Este extremo queda suficientemente demostrado por los valores del coeficiente de sedimentación de los tetrámeros, y por la masa molecular del oligómero y de las subunidades que lo componen. La naturaleza serín-esterasa de AChE queda corroborada por el marcado eficiente de la serina del centro activo con el organofosforado [3H]-DFP y la subsiguiente inactivación.

3. La AChE secretada al SFB contiene oligosacáridos complejos, como revela su interacción con distintas lectinas. El tratamiento de la enzima con PNGasa F demuestra que de los 5 sitios potenciales de N-glicosilación -identificados en la secuencia de aminoácidos- cuatro están glicosilados. Los resultados no excluyen que haya un oligosacárido en el quinto sitio.

4. A partir de las formas tetraméricas completamente hidrofílicas (G_4^S) de AChE, se generan dímeros anfifílicos, por tratamiento desnaturalizante, y monómeros anfifílicos, por ruptura de los enlaces disulfuro. Los resultados sugieren que tanto las interacciones hidrofóbicas como los enlaces disulfuro intervienen en la asociación de las subunidades catalíticas de AChE de SFB. El proceso de ensamblado más probable pasa por la unión de las subunidades para formar dímeros, trabados por puentes disulfuro, que a su vez se unen por interacciones hidrofóbicas para rendir tetrámeros.

5. La transformación de las formas G_4^S , completamente hidrofílicas, en moléculas G_2 y G_1 anfílicas sugiere que alguna región polipeptídica hidrofóbica de las subunidades enzimáticas es responsable de las propiedades anfílicas de los dímeros y monómeros Tipo II. La ausencia de restos hidrofóbicos distintos de los de la proteína explicaría la ineficacia de los métodos que separan glicolípidos o ácidos grasos para convertir estas formas anfílicas en hidrofílicas.

6. La subunidad catalítica de AChE (subunidad tipo T) posee una conformación muy flexible, que puede ser fundamental para producir la serie completa de formas moleculares. Así, las moléculas G_4^S nativas se transforman por reducción en monómeros inactivos, con una conformación "similar a la nativa", y por elevadas concentraciones de guanidina, en dímeros con subunidades desnaturalizadas. La incubación con baja concentración de guanidina mantiene el estado de agregación tetramérico propio de la proteína nativa, pero modifica su conformación y su naturaleza hidrofílica, generando un estado de "glóbulo fundido" con carácter anfílico. Dicho estado podría representar un intermedio común para distintas alternativas de plegamiento, sirviendo de precursor para las moléculas G_4^A , unidas fuertemente a las membranas a través de un tallo hidrofóbico, G_4^H , asociadas débilmente a las membranas, o G_4^S , vertidas al medio extracelular.

7. El epítipo para el anticuerpo AE-1 consiste en un dominio conformacional de la AChE, esto es, probablemente en un conjunto discontinuo de aminoácidos. La propuesta se basa en la interacción del anticuerpo con las moléculas nativas de AChE de eritrocito humano (EH) y SFB, y en su incapacidad para reconocer los componentes desnaturalizados.

8. El anticuerpo AE-1 interacciona con los oligómeros activos de EH, SFB, cerebro humano y músculo esquelético de conejo. También liga los monómeros activos de EH, pero no los monómeros de las otras fuentes, que presentan la conformación nativa (formas G_1 activas) o "similar a la nativa" (moléculas G_1 inactivas de SFB). Puesto que el antígeno natural del AE-1 es la

AChE de EH, la baja afinidad del anticuerpo por los monómeros activos de otros orígenes explicaría su incapacidad para ligarlos, mientras que la interacción quedaría facilitada, rindiendo inmunocomplejos estables, por la unión de AE-1 con dos subunidades catalíticas de la misma o de distinta molécula enzimática.

9. La AChE de eritrocito humano o bovino no incorpora grupos fosfato tras la incubación con ATP y proteína quinasa A. Por tanto, la quinasa no modifica la capacidad de la AChE de eritrocito para hidrolizar ATCh. Esto último también se observa en el caso de la enzima purificada de SFB. La AChE de eritrocito humano preincubada con fosfatasa alcalina tampoco sufre fosforilación mediada por la proteína quinasa A.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe, T., Sakai, M. y Saisu, H. (1983). A monoclonal antibody against catalytic subunits of acetylcholinesterase in the electric organ of an electric ray *Harke Japonica*. *Neurosci. Lett.* **38**: 61-66.
- Abramson, S.N., Ellisman, M.H., Deerinck, T.J., Maulet, Y., Gentry, M.K., Doctor, B.P. y Taylor, P. (1989). Differences in structure and distribution of the molecular forms of acetylcholinesterase. *J. Cell Biol.* **108**: 2301-2311.
- Aldridge, W.N. y Reiner, E. (1972). Enzyme inhibitors as substrates. Interaction of esterases with esters of organophosphorus and carbamic acids. *Front. Biol.* **26**: 1-328.
- Alexander, S. y Elder, J. (1989). Endoglycosidases from *Flavobacterium meningosepticum* application to biological problems. *Methods Enzymol.* **179**: 505-518.
- Alexandrescu, A.T., Evans, P.A., Pitkeathly, M., Baum, J. y Dobson, C.M. (1993). Structure and dynamics of the acid-denatured molten globule state of alpha-lactalbumin: a two-dimensional NMR study. *Biochemistry* **32**: 1707-1718.
- Allemand, P., Bon, S. y Massoulié, J. (1981). The quaternary structure of chicken acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase: effect of collagenase and trypsin. *J. Neurochem.* **36**: 860-867.
- Alles, G.A. y Hawes, R.C. (1940). Cholinesterases in the blood of man. *J. Biol. Chem.* **133**: 375-390.
- Andres, C., El Mourabit, M., Stutz, C., Mark, J. y Waksman, A. (1990). Are soluble and membrane-bound rat brain acetylcholinesterase different? *Neurochem. Res.* **15**: 1065-1072.
- Andres, C., Beeri, R., Lev-Lehman, E., Timberg, R., Shani, M. y Soreq, H. (1994). Transgenic overexpression of human acetylcholinesterase in mouse brain. *J. Neurochem.* **62** (Suppl. 1): S32A
- Anglister, L., Rogozinski, S. y Silman, I. (1976). Detection of hydroxyproline in preparations of acetylcholinesterase from the electric organ of the electric eel. *FEBS Lett.* **69**: 129-132.
- Anglister, L., Tarrab-Hazdai, R., Fuchs, S. y Silman, I. (1979). Immunological cross reactivity between electric-eel acetylcholinesterase and rat-tail-tendon collagen. *Eur. J. Biochem.* **94**: 25-29.
- Appleyard, M. y Jahnsen, H. (1992). Action of acetylcholinesterase in the guinea pig cerebellar cortex in vitro. *Neuroscience* **47**: 291-301.
- Appleyard, M.E. (1992). Secreted acetylcholinesterase: non-classical aspects of a classical enzyme. *Trends Neurosci.* **15**: 485-490.
- Arendt, T., Bigl, V., Tennstedt, A. y Arendt, A. (1985). Neural loss in different parts of the nucleus basalis is related to neuritic plaque formation in cortical target areas in Alzheimer's disease. *Neuroscience* **14**: 1-14.

- Arendt, T., Brückner, M.K., Lange, M. y Bigl, V. (1992). Changes in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development. A study of molecular forms. *Neurochem. Int.* **21**: 381-396.
- Arpagaus, M., Kott, M., Vatsis, K.P., Bartels, C.F., La Du, B.N. y Lockridge, O. (1990). Structure of the gene for human butyrylcholinesterase: evidence for a single copy. *Biochemistry* **29**: 124-131.
- Arpagaus, M., Chatonnet, A., Masson, P., Newton, M., Vaughan, T.A., Bartels, C.F., Nogueira, C.P., La Du, B.N. y Lockridge, O. (1991). Use of the polymerase chain reaction for homology probing of butyrylcholinesterase from several vertebrates. *J. Biol. Chem.* **266**: 6966-6974.
- Ashani, Y., Bromberg, A., Levy, D., Gentry, M.K., Brady, D.R. y Doctor, B.P. (1991). Changes in the catalytic activity of acetylcholinesterase upon complexation with monoclonal antibodies. En: *Cholinesterases: structure, function, mechanism, genetics and cell biology*, pp. 235-239. Edit. por J. Massoulié, F. Bacou, E.A. Barnard, A. Chatonnet, B.P. Doctor y D.M. Quinn. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Aslanian, D., Grof, P., Négrerie, M., Balkanski, M. y Taylor, P. (1987). Raman spectroscopy study on the conformation of 11 S form acetylcholinesterase from *Torpedo californica*. *FEBS Lett.* **219**: 202-206.
- Aslanian, D., Grof, P., Bon, S., Masson, P., Négrerie, M., Chatel, J.M., Balkanski, M., Taylor, P. y Massoulié, J. (1991). A comparative Raman spectroscopic study of cholinesterases. *Biochimie* **73**: 1375-1386.
- Attack, J.R., Perry, E.K., Bonham, J.R., Perry, R.H., Tomlinson, B.E., Blessed, G. y Fairbairn, A. (1983). Molecular forms of acetylcholinesterase in senile dementia of Alzheimer type: selective loss of the intermediate (10S) form. *Neurosci. Lett.* **40**: 199-204.
- Attack, J.R., Perry, E.K., Bonham, J.R., Candy, J.M. y Perry, R.H. (1986). Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the aged human central nervous system. *J. Neurochem.* **47**: 263-277.
- Augustinsson, K.B. y Nachmansohn, D. (1949). Distinction between acetylcholinesterase and other choline ester-splitting enzymes. *Science* **110**: 98-99.
- Bacou, F., Vigneron, P. y Massoulié, J. (1982). Acetylcholinesterase forms in fast and slow rabbit muscle. *Nature* **296**: 661-664.
- Balasubramanian, A.S. (1984). Have cholinesterases more than one function? *Trends Biochem. Sci.* **9**: 467-468.
- Balasubramanian, A.S. y Bhanumathy, C.D. (1993). Noncholinergic functions of cholinesterases. *FASEB J.* **7**: 1354-1358.
- Barak, D., Kronman, C., Ordentlich, A., Ariel, N., Bromberg, A., Marcus, D., Lazar, A., Velan, B. y Shafferman, A. (1994). Acetylcholinesterase peripheral anionic site degeneracy conferred by amino acid arrays sharing a common core. *J. Biol. Chem.* **264**: 6296-6305.

- Barak, D., Ordentlich, A., Bromberg, A., Kronman, C., Marcus, D., Lazar, A., Ariel, N., Velan, B. y Shafferman, A. (1995). Allosteric modulation of acetylcholinesterase activity by peripheral ligands involves a conformational transition of the anionic subsite. *Biochemistry* 34: 15444-15452.
- Barat, A., Gómez-Barriocanal, J. y Ramírez, G. (1984). Two classes of collagen-tailed, asymmetric molecular forms of acetylcholinesterase in skeletal muscle: differential effects of denervation. *Neurochem. Int.* 6: 403-412.
- Barrick, D. y Baldwin, R.L. (1993). Three-state analysis of sperm whale apomyoglobin folding. *Biochemistry* 32: 3790-3796.
- Bartels, C.F., Zelinski, T. y Lockridge, O. (1993). Mutation at codon 322 in the human acetylcholinesterase (AChE) gene accounts for YT blood group polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 52: 926-936.
- Barth, F. y Ghandour, M.S. (1983). Cellular localization of butyrylcholinesterase (EC 3.1.1.8) in adult rat cerebellum by immunofluorescence. *Neurosci. Lett.* 39: 149-154.
- Bartha, E., Olah, E., Szelényi, J.G. y Hollan, S.R. (1987). Characterization of "fetal-type" acetylcholinesterase in hemintreated K-562 cell culture. *Blood Cells* 12: 647-651.
- Barthalay, Y., Hipeau-Jacquotte, R., De la Escalera, S., Jimenez, F. y Piovant, M. (1990). *Drosophila* neurotactin mediates heterophilic cell adhesion. *EMBO J.* 9: 3603-3609.
- Ben Aziz-Aloya, R., Seidman, S., Timberg, R., Sternfeld, M., Zakut, H. y Soreq, H. (1993). Expression of a human acetylcholinesterase promoter-reporter construct in developing neuromuscular junctions of *Xenopus* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2471-2475.
- Berman, H.A., Yguerabide, J. y Taylor, P. (1980). Fluorescence energy transfer on acetylcholinesterase: spatial relationship between peripheral site and active centre. *Biochemistry* 19: 2226-2235.
- Berman, H.A. y Nowak, M.W. (1992). Influence of ionic composition of the medium on acetylcholinesterase. En: *Multidisciplinary approaches to cholinesterase functions*, pp. 149-156. Edit. por A. Shafferman y B. Velan. Plenum Press, New York.
- Biagioni, S., Odorisio, T., Poiana, G., Scarsella, G. y Augusti-Tocco, G. (1989). Acetylcholinesterase in the development of chick dorsal root ganglia. *J. Dev. Neurosci.* 7: 267-273.
- Blow, D.M., Birktoft, J.J. y Hartley, B.S. (1969). Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature* 221: 337-340.
- Bon, S., Huet, M., Lemonnier, M., Rieger, F. y Massoulié, J. (1976). Molecular forms of *Electrophorus* acetylcholinesterase: molecular weight and composition. *Eur. J. Biochem.* 68: 523-530.

- Bon, S. y Massoulié, J. (1976). Molecular forms of *Electrophorus* acetylcholinesterase; the catalytic subunits: fragmentation, intra- and inter-subunit disulfide bonds. *FEBS Lett.* **71**: 273-278.
- Bon, S., Cartaud, J. y Massoulié, J. (1978). The dependence of acetylcholinesterase aggregation at low ionic strength upon a polyanionic component. *Eur. J. Biochem.* **85**: 1-14.
- Bon, S., Vigny, M. y Massoulié, J. (1979). Asymmetric and globular forms of acetylcholinesterase in mammals and birds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 2546-2550.
- Bon, S. y Massoulié, J. (1980). Collagen-tailed and hydrophobic components of acetylcholinesterase in *Torpedo marmorata* electric organ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 4464-4468.
- Bon, S., Meflah, K., Musset, F., Grassi, J. y Massoulié, J. (1987). An immunoglobulin M monoclonal antibody, recognizing a subset of acetylcholinesterase molecules from electric organs of *Electrophorus* and *Torpedo*, belongs to the HNK-1 anti-carbohydrate family. *J. Neurochem.* **49**: 1720-1731.
- Bon, S., Toutant, J.P., Meflah, K. y Massoulié, J. (1988). Amphiphilic and nonamphiphilic forms of *Torpedo* cholinesterases: I. Solubility and aggregation properties. *J. Neurochem.* **51**: 776-785.
- Bon, S., Bader, M.F., Aunis, D., Massoulié, J. y Henry, J.P. (1990). Subcellular distribution of acetylcholinesterase forms in chromaffin cells. Do chromaffin granules contain a specific secretory acetylcholinesterase? *Eur. J. Biochem.* **190**: 221-232.
- Bon, S., Rosenberry, T.L. y Massoulié, J. (1991). Amphiphilic, glycosphosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC)-insensitive monomers and dimers of acetylcholinesterase. *Cell Mol. Neurobiol.* **11**: 157-172.
- Boschetti, N. y Brodbeck, U. (1996). The membrane anchor of mammalian brain acetylcholinesterase consists of a single glycosylated protein of 22 kDa. *FEBS Lett.* **380**: 133-136.
- Bossemeyer, D., Kinzel, V. y Reed, J. (1996). cAMP-dependent protein kinase: structure, function and control. En: *Protein phosphorylation*, pp. 37-79. Edit. por F. Marks. VCH Verlagsgesellschaft mbH and VCH Publishers, Inc., Weinheim and New York.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brimijoin, S. (1979). Axonal transport and subcellular distribution of molecular forms of acetylcholinesterase in rabbit sciatic nerve. *Mol. Pharmacol.* **15**: 641-648.
- Brimijoin, S. (1983). Molecular forms of acetylcholinesterase in brain, nerve and muscle: nature, localization and dynamics. *Prog. Neurobiol.* **21**: 291-322.

- Brimijoin, S., Mintz, K.P. y Alley, M.C. (1983). Production and characterization of separate monoclonal antibodies to human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Mol. Pharmacol.* **24**: 513-520.
- Brimijoin, S. y Mintz, K.P. (1985). Human acetylcholinesterase. Immunochemical studies with monoclonal antibodies. *Biochim. Biophys. Acta* **828**: 290-297.
- Brimijoin, S., Hammond, P. y Petitt, R. (1986). Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Erythrocyte acetylcholinesterase deficit analyzed by immunoassay and fluorescence-activated sorting. *Mayo Clin. Proc.* **61**: 522-529.
- Brimijoin, S. y Rakonczay, Z. (1986). Immunology and molecular biology of the cholinesterases: Current results and prospects. *Int. Rev. Neurobiol.* **28**: 363-410.
- Brimijoin, S., Balm, H., Hammond, P. y Lennon, V.A. (1990). Selective complexing of acetylcholinesterase in brain by intravenously administered monoclonal antibody. *J. Neurochem.* **54**: 236-241.
- Brock, D.J., Barron, L. y van Heyningen, V. (1985). Prenatal diagnosis of neural-tube defects with a monoclonal antibody specific for acetylcholinesterase. *Lancet* **1**: 5-8.
- Brockman, S.K., Younkin, L.H. y Younkin, S.G. (1984). The effect of spontaneous electromechanical activity on the metabolism of acetylcholinesterase in cultured embryonic rat myotubes. *J. Neurosci.* **4**: 131-140.
- Brockman, S.K., Usiak, M.F. y Younkin, S.G. (1986). Assembly of monomeric acetylcholinesterase into tetrameric and asymmetric forms. *J. Biol. Chem.* **261**: 1201-1207.
- Brockman, S.K. y Younkin, S.G. (1986). Effect of fibrillation on the secretion of acetylcholinesterase from cultured embryonic rat myotubes. *Brain Res.* **376**: 409-411.
- Brodbeck, U., Gentinetta, R. y Lundin, S.J. (1973). Multiple forms of cholinesterase from body muscle of plaice (*Pleuronectes platessa*) and possible role of sialic acid in cholinesterase reaction specificity. *Acta Chem. Scand.* **27**: 561-572.
- Brodbeck, U., Gentinetta, R. y Ott, P. (1981). Purification by affinity chromatography of red cell membrane acetylcholinesterase. En: *Membrane proteins*, pp. 85-96. Edit. por A. Azzi, U. Brodbeck y P. Zahler. Springer Verlag, Berlin.
- Brodbeck, U. y Liao, J. (1992). Subunit assembly and glycosylation of mammalian acetylcholinesterase. En: *Multidisciplinary approaches to cholinesterase functions*, pp. 33-38. Edit. por A. Shafferman y B. Velan. Plenum.
- Brown, L.M., Blair, A., Gibson, R., Everett, G.D., Cantor, K.P., Schuman, L.M., Burmeister, L.F., Van Lier, S.F. y Dick, F. (1990). Pesticide exposures and other agricultural risk factors for leukemia among men in Iowa and Minnesota. *Cancer Res.* **50**: 6585-6591.

- Brunner, J. y Semenza, G. (1981). Selective labeling of the hydrophobic core of membranes with 3-(trifluoromethyl)-3-(m-(¹²⁵I)-iodophenyl) diazirine, a carbene-generating reagent. *Biochemistry* 20: 7174-7182.
- Buamah, P.K., Evans, L. y Ward, A.M. (1980). Amniotic fluid acetylcholinesterase isoenzyme patterns in the diagnosis of neural tube defects. *Clin. Chim. Acta* 103: 147-151.
- Bucht, G., Häggström, B., Radic, Z., Osterman, A. y Hjalmarsson, K. (1994). Residues important for folding and dimerisation of recombinant *Torpedo californica* acetylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta* 1209: 265-273.
- Burstein, S.A., Adamson, J.W. y Harker, L.A. (1980). Megakaryocytopoiesis in culture: modulation by cholinergic mechanisms. *J. Cell. Physiol.* 103: 201-208.
- Busquets, X., Pérez-Tur, J., Rosario, P. y Ramírez, G. (1991). Two types of asymmetric acetylcholinesterase in chick hindlimb muscle: developmental profiles, in vivo and in cell culture and recovery after inactivation. *Cell Mol. Neurobiol.* 11: 191-201.
- Bütikofer, P., Kuypers, F.A., Shackleton, C., Brodbeck, U. y Stieger, S. (1990). Molecular species analysis of the glycosylphosphatidylinositol anchor of *Torpedo marmorata* acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* 265: 18983-18987.
- Cabezas-Herrera, J., Campoy, F.J. y Vidal, C.J. (1994a). Amphiphilic properties of molecular forms of acetylcholinesterase in normal and dystrophic muscle. *J. Neurosci. Res.* 38: 505-514.
- Cabezas-Herrera, J., Moral-Naranjo, M.T., Campoy, F.J. y Vidal, C.J. (1994b). G₄ forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in normal and dystrophic mouse muscle differ in their interaction with *Ricinus communis* agglutinin. *Biochim. Biophys. Acta* 1225: 283-288.
- Cabezas-Herrera, J., Moral-Naranjo, M.T., Campoy, F.J. y Vidal, C.J. (1997). Glycosylation of acetylcholinesterase forms in microsomal membranes from normal and dystrophic Lama2dy mouse muscle. *J. Neurochem.* 69: 1964-1974.
- Campoy, F.J., Cánovas-Muñoz, M.D., Muñoz-Delgado, E. y Vidal, C.J. (1989a). Proteolytic stimulation and solubilization of membrane-bound acetylcholinesterase from muscle sarcotubular system. *Neurochem. Res.* 14: 197-204.
- Campoy, F.J., Cánovas-Muñoz, M.D. y Vidal, C.J. (1989b). Acetylcholinesterase from muscle microsomes: molecular forms obtained by solubilization with Triton X-100 and trypsin. *Biochem. Soc. Trans.* 17: 676-677.
- Campoy, F.J. (1992). *Formas moleculares de acetilcolinesterasa de fracciones microsomales de músculo esquelético. Diferencias en su glicosilación e interacción con anticuerpos*. Tesis doctoral, Universidad de Murcia, Murcia.
- Campoy, F.J., Cabezas-Herrera, J. y Vidal, C.J. (1992). Interaction of acetylcholinesterase with *Lens culinaris* agglutinin reveals differences in glycosylation of molecular forms in sarcoplasmic reticulum membrane subfractions. *J. Neurosci. Res.* 33: 568-578.

- Cánovas-Muñoz, M.D., Campoy, F.J., Muñoz-Delgado, E. y Vidal, C.J. (1990). Amphiphilic and hydrophilic molecular forms of acetylcholinesterase in membranes derived from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* **1039**: 323-330.
- Cánovas-Muñoz, M.D., Muñoz-Delgado, E. y Vidal, C.J. (1991). Acetylcholinesterase is orientated facing the cytoplasmic side in membranes derived from sarcoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* **1076**: 259-265.
- Carroll, R.T. y Emmerling, M.R. (1991). Identification of the trypsin-like activity in commercial preparations of eel acetylcholinesterase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**: 858-862.
- Carter, J.L. y Brimijoin, S. (1981). Effects of acute and chronic denervation on release of acetylcholinesterase and its molecular forms in rat diaphragms. *J. Neurochem.* **36**: 1018-1025.
- Casnellie, J.E. (1991). Assay of protein kinases using peptides with basic residues for phosphocellulose binding. *Methods Enzymol.* **200**: 115-120.
- Chance, B. y Herbert, D. (1950). Catalases and peroxidases. XIV. Enzyme-substrate compounds of bacterial catalase and peroxidases. *Biochem. J.* **46**: 402-414.
- Chang, J.Y., Grossenbacher, H., Meyhack, B. y Maerki, W. (1993). Production of disulfide-linked hirudin dimer by in vitro folding. *FEBS Lett.* **336**: 53-56.
- Changeux, J.P. (1966). Responses of acetylcholinesterase from *Torpedo marmorata* to salts and curarizing drugs. *Mol. Pharmacol.* **2**: 369-392.
- Chatel, J.M., Grassi, J., Frobert, Y., Massoulié, J. y Vallette, F.M. (1993). Existence of an inactive pool of acetylcholinesterase in chicken brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 2476-2480.
- Chatel, J.M., Eichler, J., Vallette, F.M., Bon, S., Massoulié, J. y Grassi, J. (1994). Two-site immunoradiometric assay of chicken acetylcholinesterase: active and inactive molecular forms in brain and muscle. *J. Neurochem.* **63**: 1111-1118.
- Chatonnet, A. y Lockridge, O. (1989). Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.* **260**: 625-634.
- Chatonnet, A. y Jbilo, O. (1991). Rabbit butyrylcholinesterase gene: an evolutionary perspective. En: *Cholinesterases: structure, function, mechanism, genetics and cell biology*, pp. 157-161. Edit. por J. Massoulié, F. Bacou, E.A. Barnard, A. Chatonnet, B.P. Doctor y D.M. Quinn. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Checler, F. y Vincent, J.P. (1989). Peptidasic activities associated with acetylcholinesterase are due to contaminating enzymes. *J. Neurochem.* **53**: 924-928.
- Checler, F., Grassi, J., Masson, P. y Vincent, J.P. (1990). Monoclonal antibodies allow precipitation of esterase but not peptidase activities associated with butyrylcholinesterase. *J. Neurochem.* **55**: 750-755.

- Chow, F.L., Telen, M.J. y Rosse, W.F. (1985). The acetylcholinesterase deficit in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: evidence that the enzyme is absent from the cell membrane. *Blood* 66: 940-945.
- Christensen, H. y Pain, R.H. (1991). Molten globule intermediates and protein folding. *Eur. Biophys. J.* 19: 221-229.
- Chubb, I.W. y Smith, A.D. (1975). Release of acetylcholinesterase into the perfusate from the ox adrenal gland. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 191 B: 263-269.
- Chubb, I.W., Goodman, S. y Smith, A.D. (1976). Is acetylcholinesterase secreted from central neurons into the cerebrospinal fluid? *Neuroscience* 1: 57-62.
- Conradi, S., Ronnevi, L.O. y Lefvert, A.-K. (1990). Autoantibodies against membrane-bound acetylcholinesterase in ALS. II. Direct demonstration with ELISA-technique. *J. Neurol. Sci.* 98S: 350
- Couraud, J.Y. y Di Giamberardino, L. (1980). Axonal transport of the molecular forms of acetylcholinesterase in chick sciatic nerve. *J. Neurochem.* 35: 1053-1066.
- Couraud, J.Y., Nicolet, M. y Hässig, R. (1985). Rapid axonal transport of three molecular forms of acetylcholinesterase in the frog sciatic nerve. *Neuroscience* 14: 1141-1147.
- Coyle, J.T., Price, D.L. y DeLong, M.R. (1983). Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* 219: 1184-1190.
- Creighton, T.E. (1992). *Protein folding*. W. H. Freeman and Co., New York.
- Cygler, M., Schrag, J.D., Sussman, J.L., Harel, M., Silman, I. y Doctor, B.P. (1993). Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Protein Sci.* 2: 366-382.
- Dale, H.H. (1914). The action of certain esters of choline and their relation to muscarine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 6: 147-190.
- Dally, J.J. y Greenfield, S. (1994). The release of acetylcholinesterase in vivo is regulated by dopaminergic systems in the guinea-pig substantia nigra. *Neurochem. Int.* 25: 339-344.
- Davis, P. y Maloney, A.J. (1976). Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2: 1403
- Davis, R.E., Emmerling, M.R., Jaen, J.C., Moos, W.H. y Spiegel, K. (1993). Therapeutic intervention in dementia. *Crit. Rev. Neurobiol.* 7: 41-83.
- De la Escalera, S., Bockman, E.O., Moya, F., Piovant, M. y Jiménez, F. (1990). Characterization and gene cloning of neurotactin, a *Drosophila* transmembrane protein related to cholinesterases. *EMBO J.* 9: 3593-3601.
- De la Hoz, D., Doctor, B.P., Ralston, J.S., Rush, R.S. y Wolfe, A.D. (1986). A simplified procedure for the purification of large quantities of fetal bovine serum acetylcholinesterase. *Life Sci.* 39: 195-199.

- De la Porte, S., Vallette, F.M., Grassi, J., Vigny, M. y Koenig, J. (1986). Fetal or postsynaptic origin of acetylcholinesterase at neuromuscular junction: an immunological study in heterologous nerve-muscle cultures. *Dev. Biol.* **111**: 1-10.
- Dekosky, S.T. y Scheff, S.W. (1990). Synapse loss in frontal cortex in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann. Neurol.* **27**: 4-13.
- Di Giamberardino, L. y Couraud, J.Y. (1978). Rapid accumulation of high molecular weight acetylcholinesterase in transected sciatic nerve. *Nature* **271**: 170-172.
- Di Giamberardino, L. y Couraud, J.Y. (1984). Axonal transport as a potential mechanism of synaptic acetylcholinesterase. En: *Neuromuscular diseases*, pp. 451-460. Ed. por G. Serratrice y col. Raven Press.
- Doctor, B.P., Camp, S., Gentry, M.K., Taylor, S.S. y Taylor, P. (1983). Antigenic and structural differences in the catalytic subunits of the molecular forms of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 5767-5771.
- Doctor, B.P., Smyth, K.K., Gentry, M.K., Ashani, Y., Christner, C.E., [D.M.], Ogert, R.A. y Smith, S.W. (1989). Structural and immunochemical characterization of fetal bovine serum acetylcholinesterase. En: *Computer-assisted molecular modeling of receptor-ligand interactions: theoretical aspects and applications to drug design*, pp. 305-316. Alan R. Liss, Inc.
- Doctor, B.P., Chapman, T.C., Christner, C.E., Deal, C.D., De la Hoz, D.M., [M.K.]. (1990). Complete amino acid sequence of fetal bovine acetylcholinesterase and its comparison in various regions with other cholinesterases. *FEBS Lett.* **266**: 123-127.
- Dolgikh, D.A., Gilmanshin, R.I., Brazhnikov, E.V., Bychkova, V.E., Selezneva, G.V., Venyaminov, S.Y. y Ptitsyn, O.B. (1981). α -lactalbumin: compact or fluctuating tertiary structure? *FEBS Lett.* **136**: 311-315.
- Dolginova, E.A., Roth, E., Silman, I. y Weiner, L.M. (1992). Chemical modification of *Torpedo* acetylcholinesterase by disulfides: appearance of a "molten globule" intermediate. *Biochemistry* **31**: 12248-12254.
- Drews, U. (1975). Cholinesterase in embryonic development. *Prog. Neurobiol.* **7**: 1-53.
- Drews, U., Schmidt, H., Oettling, G. y Vanittanakom, P. (1986). Distribution of cholinesterase in the chick limb bud. *Acta Histochem. (Jena)* **32S**: 72-78.
- Drews, U. y Mengis, W. (1990). Contraction wave in the chick blastoderm induced by muscarinic stimulation. *Anat. Embryol.* **182**: 447-454.
- Dreyfus, P., Zevin-Sonkin, D., Seidman, S., Prody, C., Zisling, R., Zisling, R. y Soreq, H. (1988). Cross-homologies and structural differences between cholinesterases revealed by antibodies against c-DNA-produced butyrylcholinesterase peptides. *J. Neurochem.* **51**: 1858-1867.

- Dulley, J.R. y Grieve, P.A. (1975). A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination. *Anal. Biochem.* **64**: 136-141.
- Duval, N., Krejci, E., Grassi, J., Coussen, F., Massoulié, J. y Bon, S. (1992a). Molecular architecture of acetylcholinesterase collagen-tailed forms; construction of a glycolipid-tailed tetramer. *EMBO J.* **11**: 3255-3261.
- Duval, N., Massoulié, J. y Bon, S. (1992b). H and T subunits of acetylcholinesterase from *Torpedo*, expressed in COS cells, generate all types of globular forms. *J. Cell Biol.* **118**: 641-653.
- Duval, N., Silman, I., Sussman, J.L., Bon, S. y Massoulié, J. (1992c). Site-directed mutagenesis of active site-related residues in *Torpedo* acetylcholinesterase. *FEBS Lett.* **309**(3): 421-423.
- Edwards, J.A. y Brimijoin, S. (1982). Divergent regulation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in tissues of the rat. *J. Neurochem.* **38**: 1393-1403.
- Ehrlich, G., Ginzberg, D., Loewenstein, Y., Glick, D., Kerem, B., Ben-Ari, S., Zakut, H. y Soreq, H. (1994). Population diversity and distinct haplotype frequencies associated with acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes of Israeli Jews from trans-Caucasian Georgia and from Europe. *Genomics* **22**: 288-295.
- Eichler, J., Silman, I., Gentry, M.K. y Anglister, L. (1990). Immunocytochemical localization of phosphatidylinositol-anchored acetylcholinesterase in excitable membranes of *Torpedo ocellata*. *Mol. Brain Res.* **8**: 213-218.
- Eichler, J., Toker, L. y Silman, I. (1991). Effect of heat shock on acetylcholinesterase activity in chick muscle cultures. *FEBS Lett.* **293**: 16-20.
- Eichler, J., Silman, I. y Anglister, L. (1992). G₂-Acetylcholinesterase is presynaptically localized in *Torpedo* electric organ. *J. Neurocytol.* **21**: 707-716.
- Eichler, J., Kreimer, D.I., Varon, L., Silman, I. y Weiner, L. (1994). A "molten globule" of *Torpedo* acetylcholinesterase undergoes thiol-disulfide exchange. *J. Biol. Chem.* **269**: 30093-30096.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V.J. y Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**: 88-95.
- Fadic', R. e Inestrosa, N.C. (1989). Nerve regulation of class I and class II-asymmetric forms of acetylcholinesterase in rat skeletal muscles. *J. Neurosci. Res.* **22**: 449-455.
- Fambrough, D.M., Engel, A.G. y Rosenberry, T.L. (1982). Acetylcholinesterase of human erythrocytes and neuromuscular junctions: homologies revealed by monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 1078-1082.
- Feng, Y., Sligar, S.G. y Wand, A.J. (1994). Solution structure of apocytochrome b₅₆₂. *Nat. Struct. Biol.* **1**: 30-35.

- Fernández, H.L., Duell, M.J. y Festoff, B.W. (1979a). Neurotrophic control of 16S acetylcholinesterase at the vertebrate neuromuscular junction. *J. Neurobiol.* **10**: 441-454.
- Fernández, H.L., Duell, M.J. y Festoff, B.W. (1979b). Cellular distribution of 16 S acetylcholinesterase. *J. Neurochem.* **32**: 581-585.
- Fernández, H.L., Stiles, J.R. y Donoso, J.A. (1986). Skeletal muscle acetylcholinesterase molecular forms in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* **9**: 399-406.
- Fernández, H.L. y Donoso, J.A. (1988). Exercise selectively increases G₄ acetylcholinesterase activity in fast-twitch muscle. *J. Appl. Physiol.* **65**: 2245-2252.
- Fernández, H.L., Moreno, R.D. e Inestrosa, N.C. (1996). Tetrameric (G₄) acetylcholinesterase: structure, localization and physiological regulation. *J. Neurochem.* **66**: 1335-1346.
- Fernández-Valle, C. y Rotundo, R.L. (1989). Regulation of acetylcholinesterase synthesis and assembly by muscle activity. Effects of tetrodotoxin. *J. Biol. Chem.* **264**: 14043-14049.
- Fishman, E.B., Siek, G.C., MacCallum, R.D., Bird, E.D., Volicer, L. y Marquis, J.K. (1986). Distribution of the molecular forms of acetylcholinesterase in human brain: alterations in dementia of the Alzheimer's type. *Ann. Neurol.* **19**: 246-252.
- Fournier, D., Bride, J.M., Hofmann, F. y Karch, F. (1992). Acetylcholinesterase: two types of modifications confer resistance to insecticide. *J. Biol. Chem.* **267**: 14270-14274.
- Freedman, R.B. (1991). *Conformation and forces in protein folding*. American Association for the Advance of Science, Washington, D.C.
- Fuentes, M.E., Rosenberry, T.L. e Inestrosa, N.C. (1988). A 13 kDa fragment is responsible for the hydrophobic aggregation of brain G₄ acetylcholinesterase. *Biochem. J.* **256**: 1047-1050.
- Futerman, A.H., Low, M.G. y Silman, I. (1983). A hydrophobic dimer of acetylcholinesterase from *Torpedo californica* electric organ is solubilized by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Neurosci. Lett.* **40**: 85-89.
- Futerman, A.H., Low, M.G., Michaelson, M.M. y Silman, I. (1985). Solubilization of membrane-bound acetylcholinesterase by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J. Neurochem.* **45**: 1487-1494.
- Galehr, O. y Plattner, F. (1927). I. Fate of acetylcholine in the blood. *Arch. Ges. Physiol.* **218**: 488-505.
- García, L., Verdière-Sahuqué, M., Dreyfus, P.A., Nicolet, M. y Rieger, F. (1988a). A dimeric form of acetylcholinesterase anchored through a glycolipid in mouse skeletal muscle. *Neurochem. Int.* **13**: 327-332.

- García, L., Verdière-Sahuqué, M., Dreyfus, P.A., Nicolet, M. y Rieger, F. (1988b). Association of tailed acetylcholinesterase to lipidic membranes in mammalian skeletal muscle. *Neurochem. Int.* **13**: 231-236.
- Garen, A. y Levinthal, C. (1960). Fine-structure genetic and chemical study of the enzyme alkaline phosphatase of *Escherichia coli*. I. Purification and characterization of alkaline phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* **38**: 470-483.
- Gatley, S.J., MacGregor, R.R., Fowler, J.S., Wolf, A.P., Derwey, S.L. y Schlyer, D.J. (1990). Rapid stereoselective hydrolysis of cocaine in baboon plasma prevents its uptake in the brain. Implications for behavioural studies. *J. Neurochem.* **54**: 720-723.
- Gatley, S.J. (1991). Activities of the enantiomers of cocaine and some related compounds as substrates and inhibitors of plasma butyrylcholinesterase. *Biochem. Pharmacol.* **41**: 1249-1254.
- Gaughan, G., Park, H., Priddle, J., Craig, I. y Craig, S. (1991). Refinement of the localization of human butyrylcholinesterase to chromosome 3q26.1-q26.2 using a PCR-derived probe. *Genomics* **11**: 455-458.
- Gennari, K. y Brodbeck, U. (1985). Molecular forms of acetylcholinesterase from human caudate nucleus: comparison of salt-soluble and detergent-soluble tetrameric enzyme species. *J. Neurochem.* **44**: 697-704.
- Gentry, M.K. y Doctor, B.P. (1991). Alignment of amino acid sequences of acetylcholinesterases and butyrylcholinesterases. En: *Cholinesterases: structure, function, mechanism, genetics and cell biology*, pp. 394-398. Edit. por J. Massoulié, F. Bacou, E.A. Barnard, A. Chatonnet, B.P. Doctor y D.M. Quinn. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Gentry, M.K., Moorad, D.R., Hur, R.S., Saxena, A., Ashani, Y. y Doctor, B.P. (1995). Characterization of monoclonal antibodies that inhibit the catalytic activity of acetylcholinesterases. *J. Neurochem.* **64**: 842-849.
- George, S.T. y Balasubramanian, A.S. (1981). The aryl acylamidase and their relationship to cholinesterase in human serum, erythrocyte and liver. *Eur. J. Biochem.* **121**: 177-186.
- Gething, M.J. y Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature* **355**: 33-45.
- Getman, D.K., Eubanks, J.H., Camp, S., Evans, G.A. y Taylor, P. (1992). The human gene encoding acetylcholinesterase is located on the long arm of chromosome 7. *Am. J. Hum. Genet.* **51**: 170-177.
- Gibney, G., MacPhee-Quigley, K., Thompson, B., Vedvick, T., Low, M.G., Taylor, S.S. y Taylor, P. (1988). Divergence in primary structure between the molecular forms of acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **263**: 1140-1145.
- Gibney, G., Camp, S., Dionne, M., Mac Phee-Quigley, K. y Taylor, P. (1990). Mutagenesis of essential functional residues in acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 7546-7550.

- Gilson, M.K., Straatsma, T.P., McCammon, J.A., Ripoll, D.R., Faerman, C.H., Axelsen, P.H., Silman, I. y Sussman, J.L. (1994). Open "back door" in a molecular dynamics simulation of acetylcholine. *Science* **263**: 1276-1278.
- Gisiger, V. y Vigny, M. (1977). A specific form of acetylcholinesterase is secreted by rat sympathetic ganglia. *FEBS Lett.* **84**: 253-256.
- Gisiger, V., Vigny, M., Gautron, J. y Rieger, F. (1978). Acetylcholinesterase of rat sympathetic ganglion: molecular forms, localization and effects of denervation. *J. Neurochem.* **30**: 501-516.
- Gisiger, V. y Stephens, H.R. (1982). Acetylcholinesterase content in both motor nerve and muscle is correlated with twitch properties. *Neurosci. Lett.* **31**: 301-305.
- Gisiger, V., Sherker, S. y Gardiner, P.F. (1991). Swimming training increases the G₄ acetylcholinesterase content in both fast ankle flexors and extensor. *FEBS* **278**: 271-273.
- Gittis, A.G., Stites, W.E. y Lattman, E.E. (1993). The phase transition between a compact denatured state and a random coil state in staphylococcal nuclease is first-order. *J. Mol. Biol.* **232**: 718-724.
- Giulian, G.G., Moss, R.L. y Greaser, M. (1984). Analytical isoelectric focusing using a high-voltage vertical slab polyacrylamide gel system. *Anal. Biochem.* **142**: 421-436.
- Glick, D. (1941). Some additional observations on the specificity of cholinesterase. *J. Biol. Chem.* **137**: 456-460.
- Gnatt, A., Loewenstein, Y., Yaron, A., Schwarz, M. y Soreq, H. (1994). Site-directed mutagenesis of active site residues reveals plasticity of human butyrylcholinesterase in substrate and inhibitor interactions. *J. Neurochem.* **62**: 749-755.
- Goldman, J.E., Yen, S.H., Chin, F.C. y Peres, N.S. (1983). Lewy bodies of Parkinson's disease contain neurofilament antigens. *Science* **221**: 1082-1084.
- Gómez-Barriocanal, J., Barat, A., Escudero, E., Rodríguez-Borrajo, C. y Ramírez, G. (1981). Solubilization of collagen-tailed acetylcholinesterase from chick retina: effect of different extraction procedures. *J. Neurochem.* **37**: 1239-1249.
- Gómez-Ramos, P., Mufson, E.J. y Morán, M.A. (1992). Ultrastructural localization of acetylcholinesterase in neurofibrillary tangles, neuropil treads and senile plaques in aged and Alzheimer's brain. *Brain Res.* **569**: 229-237.
- Goto, Y. y Fink, A.L. (1989). Conformational states of β -lactamase: molten-globule states at acidic and alkaline pH with high salt. *Biochemistry* **28**: 945-952.
- Goto, Y., Calciano, L.J. y Fink, A.L. (1990a). Acid-induced folding of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 573-577.
- Goto, Y., Takahashi, N. y Fink, A.L. (1990b). Mechanism of acid-induced folding of proteins. *Biochemistry* **29**: 3480-3488.

- Gough, N.R. y Randall, W.R. (1995). Oligomerization of chicken acetylcholinesterase does not require intersubunit disulfide bonds. *J. Neurochem.* **65**: 2734-2741.
- Greenfield, S.A. (1984). Acetylcholinesterase may have novel functions in the brain. *Trends Neurosci.* **7**: 364-368.
- Greenfield, S.A. (1985). The significance of dendritic release of transmitter and protein in the substantia nigra. *Neurochem. Int.* **7**: 887-901.
- Greenfield, S.A. (1991). A noncholinergic action of acetylcholinesterase in the brain: from neuronal secretion to the generation of movement. *Cell Mol. Neurobiol.* **11**: 55-77.
- Greenfield, S.A. (1996). Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* **28**: 485-490.
- Grifman, M., Arbel, A., Ginzberg, D., Glick, D., Elgavish, S., Shaanan, B. y Soreq, H. (1997). In vitro phosphorylation of acetylcholinesterase at non-consensus protein kinase A sites enhances the rate of acetylcholine hydrolysis. *Mol. Brain Res.* **51**: 179-187.
- Gross, E. (1967). The cyanogen bromide reaction. *Methods Enzymol.* **11**: 238-255.
- Groswald, D.E. y Dettbarn, W.D. (1983). Characterization of acetylcholinesterase molecular forms in slow and fast muscle of rat. *Neurochem. Res.* **8**: 983-995.
- Grumet, M., Hoffman, S., Crossin, K.L. y Edelman, G. (1985). Cytotactin, an extracellular matrix protein of neural and nonneural tissues that mediates glia-neuron interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 8075-8079.
- Haas, R., Adams, E.W., Rosenberry, M.A. y Rosenberry, T.L. (1992). Substrate-selective inhibition and peripheral site labeling of cholinesterase by platinum (terpyridine) chloride. En: *Multidisciplinary approaches to cholinesterase function*, pp. 131-140. Edit. por A. Shafferman y B. Velan. Plenum Press, New York.
- Haass, C. y Selkoe, D.J. (1993). Cellular processing of β -amyloid precursor protein and the genesis of amyloid β -peptide. *Cell* **75**: 1039-1042.
- Hagihara, Y., Aimoto, S., Fink, A.L. y Goto, Y. (1993). Guanidine hydrochloride-induced folding of proteins. *J. Mol. Biol.* **231**: 180-184.
- Hall, Z.W. y Kelly, R.B. (1971). Enzymatic detachment of endplate acetylcholinesterase from muscle. *Nature* **232**: 62-63.
- Hall, Z.W. (1973). Multiple forms of acetylcholinesterase and their distribution in endplate and non-endplate regions of rat diaphragm muscle. *J. Neurobiol.* **4**: 343-361.
- Hammond, P. y Brimijoin, S. (1988). Acetylcholinesterase in Huntington's and Alzheimer's diseases: simultaneous enzyme assay and immunoassay of multiple brain regions. *J. Neurochem.* **50**: 1111-1116.

- Hardie, D.G., Campbell, D.G., Caudwell, F.B. y Haystead, T.A.J. (1993). Analysis of sites phosphorylated in vivo and in vitro. En: *Protein phosphorylation. A practical approach*, pp. 61-85. Edit. por D.G. Hardie. Oxford University Press Inc., New York.
- Harel, M., Sussman, J.L., Krejci, E., Bon, S., Chanal, P., Massoulié, J. y Silman, I. (1992). Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase, modeling and mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 10827-10831.
- Hasan, F.B., Cohen, S.G. y Cohen, J.B. (1980). Hydrolysis by acetylcholinesterase. Apparent molar volumes and trimethyl and methyl subsites. *J. Biol. Chem.* **255**: 3898-3904.
- Hasinoff, B.B. (1982). Kinetics of acetylthiocholine binding to electric eel acetylcholinesterase in glycerol/water solvents of increased viscosity. Evidence for a diffusion-controlled reaction. *Biochim. Biophys. Acta* **704**: 52-58.
- Heider, H., Meyer, P., Liao, J., Stieger, S. y Brodbeck, U. (1991). Studies on the tetrameric amphiphilic acetylcholinesterase from bovine caudate nucleus: hydrophobic domains, membrane anchoring and state of glycosylation. En: *Cholinesterases: structure, function, mechanism, genetics and cell biology*, pp. 32-36. Edit. por J. Massoulié, F. Bacou, E.A. Barnard, A. Chatonnet, B.P. Doctor y D.M. Quinn. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Heider, H. y Brodbeck, U. (1992). Monomerization of tetrameric bovine caudate nucleus acetylcholinesterase. Implications for hydrophobic assembly and membrane anchor attachment site. *Biochem. J.* **281**: 279-284.
- Helenius, A. y Simons, K. (1975). Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **415**: 29-79.
- Hendrick, J.P. y Hartl, F. (1993). Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **62**: 349-384.
- Hirano, A. (1973). Progress in the pathology of motor neuron disease. *Prog. Neuropathol.* **2**: 181-215.
- Hodgson, A.J. (1978). *Soluble acetylcholinesterase in the nervous system*. D. Phil. Thesis, Oxford.
- Hodgson, A.J. y Chubb, I.W. (1983). Isolation of the secretory form of soluble acetylcholinesterase by using affinity chromatography on edrophonium-sepharose. *J. Neurochem.* **41**: 654-662.
- Hoffman, P.W., Ravindran, A. y Haganir, R.L. (1994). Role of phosphorylation in desensitization of acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Neurosci.* **14**: 4185-4195.
- Hutchinson, D.O., Walls, T.J., Nakano, S., Camp, S., Taylor, P., Harper, C.M., Groover, R.V., Peterson, H.A., Jamieson, D.G. y Engel, A.G. (1993). Congenital endplate acetylcholinesterase deficiency. *Brain* **116**: 633-653.

- Inestrosa, N.C., Matthew, W.D., Reiness, C.G., Hall, Z.W. y Reichardt, L.F. (1985). Atypical distribution of asymmetric acetylcholinesterase in mutant PC12 pheochromocytoma cells lacking a cell surface heparan sulfate-proteoglycan. *J. Neurochem.* **45**: 86-94.
- Inestrosa, N.C., Roberts, W.L., Marshall, T. y Rosenberry, T.L. (1987). Acetylcholinesterase from bovine caudate nucleus is attached to membranes by a novel subunit distinct from those of acetylcholinesterase in other tissues. *J. Biol. Chem.* **262**: 4441-4444.
- Inestrosa, N.C., Fuentes, M.E., Anglister, L., Futerman, A.H. y Silman, I. (1988). A membrane-associated dimer of acetylcholinesterase from *Xenopus* skeletal muscle is solubilized by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Neurosci. Lett.* **90**: 186-190.
- Inestrosa, N.C. y Perelman, A. (1989). Distribution and anchoring of molecular forms of acetylcholinesterase. *Trends Pharmacol. Sci.* **10**: 325-329.
- Inestrosa, N.C. y Perelman, A. (1990). Association of acetylcholinesterase with the cell surface. *J. Membr. Biol.* **118**: 1-9.
- Inestrosa, N.C., Alvarez, A., Pérez, C.A., Moreno, R.D., Vicente, M., Linicor, C., Casanueva, O.I., Soto, C. y Garrido, J. (1996). Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron* **16**: 881-891.
- Jaenicke, R. (1991). Protein folding: local structures, domains, subunits, and assemblies. *Biochemistry* **30**: 3147-3161.
- James, E., Wu, P.G., Stites, W. y Brand, L. (1992). Compact denatured state of a staphylococcal nuclease mutant by guanidinium as determined by resonance energy transfer. *Biochemistry* **31**: 10217-10225.
- Jansz, H.J., Brons, D. y Warringa, M.G.P.J. (1959). Chemical nature of DFP-binding site of pseudocholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta* **34**: 573-575.
- Jasmin, B.J., Cartaud, J., Bornens, M. y Changeux, J.P. (1989). Golgi apparatus in chick skeletal muscle: changes in its distribution during endplate development and after denervation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 72018-72022.
- Jasmin, B.J. y Gisiger, V. (1990). Regulation by exercise of the pool of G₄ acetylcholinesterase characterizing fast muscles: opposite effect of running training in antagonist muscles. *J. Neurosci.* **10**: 1444-1454.
- Jasmin, B.J., Lee, R.K. y Rotundo, R.L. (1991). Analysis of acetylcholinesterase gene expression at the avian neuromuscular junction by quantitative PCR. *J. Cell Biol.* **115**: 30a
- Johnson, C.D. y Russell, R.L. (1975). A rapid, simple radiometric assay for cholinesterase, suitable for multiple determinations. *Anal. Biochem.* **64**: 229-238.

- Jones, S.A., Holmes, C., Budd, T.C. y Greenfield, S.A. (1995). The effect of acetylcholinesterase on outgrowth of dopaminergic neurons in dopaminergic slice culture of rat mid-brain. *Cell Tissue Res.* **279**: 323-330.
- Kamban, J.R., Franks, J.J., Mets, B., Janicki, P.K., Hickman, R. y Van der Watt, M. (1994). The effect of hepatectomy and plasma cholinesterase inhibition on cocaine metabolism and cardiovascular responses in pigs. *J.Lab.Clin.Med.* **124**: 715-722.
- Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Mulhaup, G., Beyreuther, K. y Müller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **325**: 733-736.
- Karnovsky, M.J. y Roots, L. (1964). A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.* **12**: 219-232.
- Karpel, R., Ben Aziz-Aloya, R., Sternfeld, M., Ehrlich, G., Ginzberg, D., Tarroni, P., Clementi, F., Zakut, H. y Soreq, H. (1994). Expression of three alternative acetylcholinesterase messenger RNAs in human tumor cell lines of different tissues origins. *Exp. Cell Res.* **210**: 268-277.
- Katz, B. (1966). *Nerve, muscle and synapse*. McGraw Hill, New York.
- Katzman, R. y Saitoh, T. (1991). Advances in Alzheimer's disease. *FASEB J.* **5**: 278-286.
- Keilhauer, G., Faissner, A. y Schachner, M. (1985). Differential inhibition of neuron-neuron, neuron-astrocyte and astrocyte-astrocyte adhesion by L1, L2 and N-CAM antibodies. *Nature* **316**: 728-730.
- Kemp, B.E., Graves, D.J., Benjamini, E. y Krebs, E.G. (1977). Role of multiple basic residues in determining the substrate specificity of cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **252**: 4888-4894.
- Kerem, A., Kronman, C., Bar-Nun, S., Shafferman, A. y Velan, B. (1993). Interrelations between assembly and secretion of recombinant human acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **268**: 180-184.
- Kieffer, B., Goeldner, M., Hirth, C., Aebersold, R. y Chang, J.Y. (1986). Sequence determination of a peptide fragment from electric eel acetylcholinesterase involved in the binding of quaternary ammonium. *FEBS Lett.* **202**: 91-96.
- Kim, B.H. y Rosenberry, T.L. (1985). A small hydrophobic domain that localizes human erythrocyte acetylcholinesterase in liposomal membranes is cleaved by papain digestion. *Biochemistry* **24**: 3586-3592.
- Kim, P.S. y Baldwin, R.L. (1990). Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 631-660.
- Koelle, G.B. y Friedenwald, J.S. (1949). A histochemical method for localizing cholinesterase activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **70**: 617-622.

- Kornfeld, R. y Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **54**: 631-634.
- Kostovic, I. y Goldman-Rakic, P.S. (1983). Transient cholinesterase staining in the mediodorsal nucleus of the thalamus and its connections in the developing human and monkey brain. *J. Comp. Neurol.* **219**: 431-447.
- Kreimer, D.I., Dolginova, E.A., Raves, M., Sussman, J.L., Silman, I. y Weiner, L. (1994a). A metastable state of *Torpedo californica* acetylcholinesterase generated by modification with organomercurials. *Biochemistry* **33**: 14407-14418.
- Kreimer, D.I., Szosenfogel, R., Goldfarb, D., Silman, I. y Weiner, L. (1994b). Two-state transition between molten globule and unfolded states of acetylcholinesterase as monitored by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 12145-12149.
- Krejci, E., Duval, N., Chatonnet, A., Vincens, P. y Massoulié, J. (1991). Cholinesterase-like domains in enzymes and structural proteins: functional and evolutionary relationships and identification of a catalytically essential aspartic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 6647-6651.
- Kristt, D.A. (1983). Acetylcholinesterase in the ventrobasal thalamus: transience and patterning during ontogenesis. *Neuroscience* **10**: 923-939.
- Kristt, D.A. y Kasper, E.K. (1983). High density of cholinergic-muscarinic receptors accompanies high-intensity of acetylcholinesterase staining in layer-IV of infant rat somatosensory cortex. *Dev. Brain Res.* **8**: 373-376.
- Kronman, C., Velan, B., Marcus, D., Ordentlich, A., Reuveny, S. y Shafferman, A. (1995). Involvement of oligomerization, N-glycosylation and sialylation in the clearance of cholinesterases from the circulation. *Biochem. J.* **311**: 959-967.
- Kuwajima, K. (1989). The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure. *Proteins* **6**: 87-103.
- L'Na, C. y Changeux, J.P. (1993). Allosteric modulation of the nicotinic acetylcholine receptor. *Trends Neurolog. Sci.* **16**: 181-186.
- La Du, B.N., Bartels, C.F., Nogueira, C.P., Arpagaus, M. y Lockridge, O. (1991). Proposed nomenclature for human butyrylcholinesterase genetic variants identified by DNA sequencing. *Cell Mol. Neurobiol.* **11**: 79-90.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Landwehrmeyer, B., Probst, A., Palacios, J.M. y Mengod, G. (1993). Expression of acetylcholinesterase messenger RNA in human brain: an in situ hybridization study. *Neuroscience* **57**: 615-634.
- Lapidot-Lifson, Y., Prody, C.A., Ginzberg, D., Meytes, D., Zakut, H. y Soreq, H. (1989). Co-amplification of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes in blood cells: correlation with various leukemias and abnormal megakaryocytopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 4715-4719.

- Lappin, R., Lee, I., Rubin, L. y Lieberburg, I.M. (1987). Generation of subunit specific antibody probes for *Torpedo* acetylcholinesterase: cross-species reactivity and use in cell-free translations. *J. Neurobiol.* **18**: 75-99.
- Layer, P.G. (1990). Cholinesterases preceding major tracts in vertebrate neurogenesis. *Bioessays* **12**: 415-420.
- Layer, P.G. (1991a). Expression and possible functions of cholinesterases during chicken neurogenesis. En: *Cholinesterases: structure, function, mechanism, genetics and cell biology*. pp. 350-357. Edit. por J. Massoulié, F. Bacou, E.A. Barnard, A. Chatonnet, B.P. Doctor y D.M. Quinn. American Chemical Society, Washington D.C.
- Layer, P.G. (1991b). Cholinesterases during development of the avian nervous system. *Cell Mol. Neurobiol.* **11**: 7-33.
- Layer, P.G. (1992). Towards a functional analysis of cholinesterases in neurogenesis: histological, molecular and regulatory features of butyrylcholinesterase from chicken brain. En: *Multidisciplinary approaches to cholinesterase functions*. pp. 223-232. Edit. por A. Shafferman y B. Velan. Plenum Press, New York.
- Layer, P.G., Weikert, T. y Alber, R. (1993). Cholinesterase regulate neurite growth of chick nerve cells in vitro by means of a non-enzymatic mechanism. *Cell Tissue Res.* **273**: 219-226.
- Layer, P.G. y Willbold, E. (1995). Novel functions of cholinesterases in development, physiology and disease. *Prog. Histochem. Cytochem.* **29**: 1-99.
- Layne, E. (1957). Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods Enzymol.* **3**: 447-454.
- Lazar, M. y Vigny, M. (1980). Modulation of the distribution of acetylcholinesterase molecular forms in a murine neuroblastoma x sympathetic ganglion cell hybrid cell line. *J. Neurochem.* **35**: 1067-1079.
- Lazar, M., Salmeron, E., Vigny, M. y Massoulié, J. (1984). Heavy isotope-labeling study of the metabolism of monomeric and tetrameric acetylcholinesterase forms in the murine neuronal-like T28 hybrid cell line. *J. Biol. Chem.* **259**: 3703-3713.
- Le Maire, M., Deschamps, S., Moller, J.V., Le Caer, J.P. y Rossier, J. (1993). Electrospray ionization mass spectrometry on hydrophobic peptides electroeluted from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Application to the topology of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Anal. Biochem.* **214**: 50-57.
- Lee, R.K., Jasmin, B.J. y Rotundo, R.L. (1992). Discordant expression of acetylcholinesterase activity and mRNA levels in single neuromuscular junctions of normal muscle. *Soc. Neurosci. Abstr.* **18**: 1556.
- Lee, S.L. y Taylor, P. (1982). Structural characterization of the asymmetric (17+13) S species of acetylcholinesterase from *Torpedo*. II. Component peptides obtained by selective proteolysis and disulfide bond reduction. *J. Biol. Chem.* **257**: 12292-12301.

- Legay, C., Bon, S., Vernier, P., Coussen, F. y Massoulié, J. (1993). Cloning and expression of a rat acetylcholinesterase subunit: generation of multiple molecular forms and complementarity with a *Torpedo* collagenic subunit. *J. Neurochem.* **60**: 337-346.
- Leibel, W.S. (1988a). Antisera probes to an atypical pseudocholinesterase from surgeonfish reveal immunochemical variability and tissue-specific molecular polymorphism. *J. Exp. Zool.* **247**: 209-233.
- Leibel, W.S. (1988b). Characterization of a pseudocholinesterase purified from surgeonfish tissues confirms the atypical nature of this enzyme. *J. Exp. Zool.* **247**: 198-208.
- Li, Y., Camp, S., Rachinsky, T.L., Getman, D. y Taylor, P. (1991). Gene structure of mammalian acetylcholinesterase. Alternative exons dictate tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.* **266**: 23083-23090.
- Li, Z.Y. y Bon, C. (1983). Presence of a membrane-bound acetylcholinesterase form in a preparation of nerve endings from *Torpedo marmorata* electric organ. *J. Neurochem.* **40**: 338-349.
- Liao, D.I. y Remington, S.J. (1990). Structure of wheat serine carboxypeptidase II at 3.5 Å resolution. A new class of serine proteinase. *J. Biol. Chem.* **265**: 6528-6531.
- Liao, J., Heider, H., Sun, M.C., Stieger, S. y Brodbeck, U. (1991). The monoclonal antibody 2G8 is carbohydrate-specific and distinguishes between different forms of vertebrate cholinesterases. *Eur. J. Biochem* **198**: 59-65.
- Liao, J., Heider, H., Sun, M.C. y Brodbeck, U. (1992). Different glycosylation in acetylcholinesterases from mammalian brain and erythrocytes. *J. Neurochem.* **58**: 1230-1238.
- Liao, J., Norgaard-Pedersen, B. y Brodbeck, U. (1993). Subunit association and glycosylation of acetylcholinesterase from monkey brain. *J. Neurochem.* **61**: 1127-1134.
- Liao, J., Boschetti, N., Mortensen, V., Jensen, S.P., Koch, C., Norgaard-Pedersen, B. y Brodbeck, U. (1994). Characterization of salt-soluble forms of acetylcholinesterase from bovine brain. *J. Neurochem.* **63**: 1446-1453.
- Linkhart, T.A. y Hauschka, S.D. (1979). Clonal analysis of vertebrate myogenesis. VI. Acetylcholinesterase and acetylcholine receptor in myogenic and nonmyogenic clones from chick embryo leg cells. *Devl Biol.* **69**: 529-548.
- Lipton, S.A. y Kater, S.B. (1989). Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival. *TINS* **7**: 265-270.
- Lis, H. y Sharon, N. (1986). Lectins as molecules and as tools. *Annu. Rev. Biochem.* **55**: 35-67.

- Livneh, A., Sarova, I., Michaeli, D., Pras, M., Wagner, K., Zakut, H. y Soreq, H. (1988). Antibodies against acetylcholinesterase and low levels of cholinesterases in a patient with an atypical neuromuscular disorder. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **48**: 119-131.
- Lockridge, O., Eckerson, H.W. y La Du, B.N. (1979). Interchain disulfide bonds and subunit organization in human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.* **254**: 8324-8330.
- Lockridge, O., Adkins, S. y La Du, B.N. (1987a). Location of disulfide bonds within the sequence of human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.* **262**: 12945-12952.
- Lockridge, O., Bartels, C.G., Vaughan, T.A., Wong, C.K., Norton, S.E. y Johnson, L.L. (1987b). Complete aminoacid sequence of human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.* **262**: 549-557.
- Lockridge, O. (1988). Structure of human serum cholinesterase. *Bioessays* **9**: 125-128.
- Lockridge, O. (1991). Structure of human butyrylcholinesterase gene and expression in mammalian cells. En: *Cholinesterases: structure, function, mechanism, genetics and cell biology*, pp. 168-171. Edit. por J. Massoulié, F. Bacou, E.A. Barnard, A. Chatonnet, B.P. Doctor y D.M. Quinn. American Chemical Society, Washintong D.C.
- Lockridge, O., Bartels, C.F., Nogueira, C.P., Arpagaus, M., Adkins, S. y LaDu, B.N. (1991). Nomenclature for human butyrylcholinesterase genetic variants identified by DNA sequencing. En: *Cholinesterases: structure, function, mechanism, genetics and cell biology*, p. 193. Edit. por J. Massoulié, F. Bacou, E.A. Barnard, A. Chatonnet, B.P. Doctor y D.M. Quinn. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Loewi, O. y Navratil, E. (1926). Über humorale ubertragbarkeit der herznervenwirkung. XI. Über den mechanismus der vaguswirkung von physostigmin und ergotamin. *Pflüger. Arch. Ges. Physiol.* **214**: 689-696.
- Lomo, T., Massoulié, J. y Vigny, M. (1985). Stimulation of denervated rat soleus muscle with fast and slow activity patterns induces different expression of acetylcholinesterase molecular forms. *J. Neurosci.* **5**: 1180-1187.
- Low, M.G. y Finean, J.B. (1977). Non-lytic release of acetylcholinesterase from erythrocytes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *FEBS Lett.* **82**: 143-146.
- Low, M.G. (1989a). The glycosyl-phosphatidylinositol anchor of membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **988**: 427-454.
- Low, M.G. (1989b). Glycosyl-phosphatidylinositol: a versatile anchor for cell surface proteins. *FASEB J.* **3**: 1600-1608.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

- Lucas, C.A. y Kreutzberg, G.W. (1985). Regulation of acetylcholinesterase secretion from neuronal cell cultures. I. Actions of nerve growth factor, cytoskeletal inhibitors and tunicamycin. *Neuroscience* **14**: 349-360.
- Lyles, J.M., Barnard, E.A. y Silman, I. (1980). Changes in the levels and forms of cholinesterases in the blood plasma of normal and dystrophic chickens. *J. Neurochem.* **34**: 978-987.
- Mac Phee-Quigley, K., Vedvick, T.S., Taylor, P. y Taylor, S. (1986). Profile of the disulfide bonds in acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **261**: 13565-13570.
- MacPhee-Quigley, K., Drotar, A.M., Vedvick, T., Taylor, P. y Taylor, S.S. (1987). Characterization of the glycosylation sites of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*. *Fed. Proc.* **46**: 2150
- Mailly, P., Ben Younés-Chennoufi, A. y Bon, S. (1989). The monoclonal antibodies Elec-39, HNK-1 and NC-1 recognize common structures in the nervous system and muscles of vertebrates. *Neurochem. Int.* **15**: 517-530.
- Main, A.R. (1979). Mode of action of anticholinesterases. *Pharmac. Ther.* **6**: 579-628.
- Maley, F., Trimble, R.B., Tarentino, A.L. y Plummer, T.H.J. (1989). Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal. Biochem.* **180**: 195-204.
- Manavalan, P., Taylor, P. y Johnson, W.C.J. (1985). Circular dichroism studies of acetylcholinesterase conformation. Comparison of the 11 S and 5.6 S species and the differences induced by inhibitory ligands. *Biochim. Biophys. Acta* **829**: 365-370.
- Marnay, A. (1937). Cholinestérase dans l'organe électrique de la Torpille. *Compt. Rend. Soc. Biol.* **126**: 573-574.
- Marnay, A. y Nachmansohn, D. (1937). Cholinestérase dans le muscle estrié. *Compt. Rend. Soc. Biol.* **124**: 942-944.
- Marnay, A. y Nachmansohn, D. (1938). Cholinesterase in voluntary muscle. *J. Physiol.* **92**: 37-47.
- Marquis, J.K. y Fishman, E.B. (1985). Presynaptic acetylcholinesterase. *Trends Pharmacol. Sci.* **6**: 387-388.
- Marsh, D., Grassi, J., Vigny, M. y Massoulié, J. (1984). An immunological study of rat acetylcholinesterase: comparasion with acetylcholinesterase from other vertebrates. *J. Neurochem.* **43**: 204-213.
- Marshall, T. y Latner, A.L. (1981). Incorporation of methylamine in an ultrasensitive silver stain for detecting protein in thick polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **2**: 228-235.
- Martin, J., Langer, T., Boteva, R., Schramel, A., Horwich, A.L. y Hartl, F. (1991). Chaperonin-mediated protein folding at the surface of gro EL through a "molten globule"-like intermediate (see comments). *Nature* **352**: 36-42.

- Martin, R.G. y Ames, B.N. (1961). A method for determining the sedimentation behaviour of enzymes. Applications to protein mixtures. *J. Biol. Chem.* **236**: 1372-1379.
- Martín-Valmaseda, E.M., Sánchez-Yagüe, J., Cabezas, J.A. y Llanillo, M. (1995). Biochemical characterization of sheep platelet acetylcholinesterase after detergent solubilization. *Comp. Biochem. Physiol.* **110B**: 91-101.
- Mash, D.C., Flynn, D.D. y Potter, L.T. (1985). Loss of M2 muscarinic receptors in the cerebral cortex in Alzheimer's disease and experimental cholinergic denervation. *Science* **228**: 1115-1117.
- Masson, P. (1989). A naturally occurring molecular form of human plasma cholinesterase is an albumin conjugate. *Biochim. Biophys. Acta* **988**: 258-266.
- Masson, P. (1991). Molecular heterogeneity of human plasma cholinesterase. En: *Cholinesterases: structure, function, mechanism, genetics and cell biology*, pp. 42-46. Edit. por J. Massoulié, F. Bacou, E.A. Barnard, A. Chatonnet, B.P. Doctor y D.M. Quinn. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Massoulié, J. y Bon, S. (1982). The molecular forms of cholinesterases and acetylcholinesterase in vertebrates. *Annu. Rev. Neurosci.* **5**: 57-106.
- Massoulié, J., Toutant, J.P. y Bon, S. (1988). Characterization of amphiphilic forms of cholinesterases by their interactions with nondenaturing detergents in centrifugation and charge-shift electrophoresis. En: *Post-translational modification of proteins by lipids*, pp. 132-142. Edit. por U. Brodbeck y C. Bordier. Springer, Berlin.
- Massoulié, J., Sussman, J.L., Doctor, B.P., Soreq, H., Velan, B., Cygler, M., Rotundo, R.L., Shafferman, A., Silman, I. y Taylor, P. (1992). Recommendations for nomenclature in cholinesterases. En: *Multidisciplinary approaches to cholinesterase functions*, pp. 285-288. Edit. por A. Shafferman y B. Velan. Plenum Press, New York.
- Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E. y Vallette, F.M. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog. Neurobiol.* **41**: 31-91.
- Maulet, Y., Camp, S., Gibney, G., Rachinsky, T.L., Ekström, T.J. y Taylor, P. (1990). Single gene encodes glycopospholipid-anchored and asymmetric acetylcholinesterase forms: alternative coding exons contain inverted repeat sequences. *Neuron* **4**: 289-301.
- Mayo, K.H., Barker, S., Kuranda, M.J., Hunt, A.J., Myers, J.A. y Maione, T.E. (1992). Molten globule monomer to condensed dimer: role of disulfide bonds in platelet factor-4 folding and subunit association. *Biochemistry* **31**: 12255-12265.
- McMahan, U.J., Sanes, J.R. y Marshall, L.M. (1978). Cholinesterase is associated with the basal lamina at the neuromuscular junction. *Nature* **271**: 172-174.
- Mendel, B. y Rudney, H. (1943). Studies on cholinesterase. I. Cholinesterase and pseudocholinesterase. *Biochem. J.* **37**: 59-63.

- Mendoza, J.A., Butler, M.C. y Horowitz, P.M. (1992). Characterization of a stable, reactivatable complex between chaperonin 60 and mitochondrial rhodanese. *J. Biol. Chem.* **267**: 24648-24654.
- Meneely, G.A. y Wyttenbach, C.R. (1989). Effects of the organophosphate insecticides diazinon and parathion on bob-white quail embryos: skeletal defects and acetylcholinesterase activity. *J. exp. Biol.* **252**: 60-70.
- Mesulam, M.M., Geula, C. y Morán, M.A. (1987). Anatomy of cholinesterase inhibition in Alzheimer's disease: effects of physostigmine and tetrahydroaminoacridine on plaques and tangles. *Ann. Neurol.* **22**: 683-691.
- Metz, J., Bradlow, B.A., Lewis, S.M. y Dacie, J.V. (1960). The acetylcholinesterase activity of the erythrocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: relation to the severity of the disease. *Br. J. Haematol.* **6**: 372
- Michaelson, S. y Small, D.H. (1993). A protease is recovered with a dimeric form of acetylcholinesterase in fetal bovine serum. *Brain Res.* **611**: 75-80.
- Mintz, K.P. y Brimijoin, S. (1985). Two-step immunoaffinity purification of acetylcholinesterase from rabbit brain. *J. Neurochem.* **44**: 225-232.
- Misawa, M., Doull, J., Kitos, P.A. y Kyeki, E.M. (1981). Teratogenic effects of cholinergic insecticides in chick embryos. I. Diazinon treatment on acetylcholinesterase and acetyltransferase activities. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **57**: 20-29.
- Mizobe, F. y Livett, B.G. (1983). Nicotine stimulates secretion of both catecholamines and acetylcholinesterase from cultured adrenal chromaffin cells. *J. Neurosci.* **3**: 871-876.
- Moral-Naranjo, M.T., Cabezas-Herrera, J. y Vidal, C.J. (1996). Molecular forms of acetyl- and butyrylcholinesterase in normal and dystrophic mouse brain. *J. Neurosci. Res.* **43**: 224-234.
- Morán, M.A., Mufson, E.J. y Gómez-Ramos, P. (1994). Cholinesterases colocalize with sites of neurofibrillary degeneration in aged and Alzheimer's brain. *Acta Neuropathol.* **87**: 284-292.
- Moran, P. y Caras, I.W. (1992). Fusion of sequence elements from nonanchored proteins to generate a fully functional signal for glycoposphatidylinositol membrane anchor attachment. *J. Cell Biol.* **115**: 1595-1600.
- Moya-Quiles, M.R., Villalba-Sánchez, J., Muñoz-Delgado, E. y Vidal, C.J. (1992). Alkaline treatment of muscle microsomes releases amphiphilic and hydrophilic forms of acetylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta* **1121**: 88-96.
- Mössner, E., Boll, M. y Pfeleiderer, G. (1980). Purification of human and bovine alkaline phosphatases by affinity chromatography. *Z. Physiol. Chem.* **361**: 543-549.
- Mullan, M. y Crawford, F. (1993). Genetic and molecular advances in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* **16**: 398-403.

- Muller, F., Cédard, L., Boué, J., Giraudet, P., Massoulié, J. y Boué, A. (1986). Diagnostic prénatal des défauts de fermeture du tube neural. Intérêt de l'électrophorèse de cholinestérases. *Presse Méd.* **15**: 783-786.
- Muñoz-Delgado, E. (1985). *Solubilización y propiedades de la acetilcolinesterasa del sistema sarcotubular de músculo blanco de conejo*. Tesis doctoral. Universidad de Murcia, Murcia.
- Muñoz-Delgado, E. y Vidal, C.J. (1987). Solubilization and partial characterization of acetylcholinesterase from the sarcotubular system of skeletal muscle. *Neurochem. Res.* **12**: 597-605.
- Musset, F., Frobert, Y., Grassi, J., Vigny, M., Boulla, G., Bon, S. y Massoulié, J. (1987). Monoclonal antibodies against acetylcholinesterase from electric organs of *Electrophorus* and *Torpedo*. *Biochimie* **69**: 147-156.
- Mutus, B., Duncan, D.V. y Tomlinson, G. (1983). Modifications of acetylcholinesterase with the fluorescent thiol reagent S-mercuric-N-dansylcysteine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **112**: 941-947.
- Nachmansohn, D. y Neumann, E. (1975). *Chemical and molecular basis of nerve activity*. Academic Press, New York.
- Narhi, L.O., Rosenfeld, R., Wen, J., Arakawa, T., Prestrelski, S.J. y Philo, J.S. (1993). Acid-induced unfolding of brain-derived neurotrophic factor results in the formation of a monomeric "a state". *Biochemistry* **32**: 10819-10825.
- Navaratnam, D.S., Priddle, J.D., McDonald, B., Esiri, M.M., Robinson, J.R. y Smith, A.D. (1991). Anomalous molecular form of acetylcholinesterase in cerebrospinal fluid in histologically diagnosed Alzheimer's disease. *Lancet* **337**: 447-450.
- Neville, L.F., Gnatt, A., Loewenstein, Y., Seidman, S., Ehrlich, G. y Soreq, H. (1992). Intra-molecular relationships in cholinesterases revealed by oocyte expression of site-directed and natural variants of human butyrylcholinesterase. *EMBO J.* **11**: 1641-1649.
- Nicolet, M., García, L., Dreyfus, P.A., Verdière-Sahuqué, M., Pincon-Raymond, M. y Rieger, F. (1987). Hydrophilic and hydrophobic attachment of both globular and asymmetric acetylcholinesterase to frog muscle membranes and muscles basal lamina sheaths. *Neurochem. Int.* **11**: 189-198.
- O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021.
- Oakley, B.R., Kirsch, D.R. y Morris, N.R. (1980). A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **105**: 361-363.
- Oettling, G., Schmidt, H., Show-Klett, A. y Drews, U. (1988). Expression of the Ca²⁺ mobilizing muscarinic system in the chick embryo correlates with morphogenesis. *Cell Differ.* **23**: 77-86.

- Ogert, R.A., Gentry, M.K., Richardson, E.C., Deal, C.D., Abramson, S.N., Alving, C.R., Taylor, P. y Doctor, B.P. (1990). Studies on the topography of the catalytic site of acetylcholinesterase using polyclonal and monoclonal antibodies. *J. Neurochem.* 55: 756-763.
- Ollis, D.L., Chean, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J.D., Sussman, J.L., Versschueren, K.H.G. y Goldman, A. (1992). The α/β hydrolase fold. *Protein Eng.* 5: 197-211.
- Olson, C.E., Chhajlani, V., August, J.T. y Schmeil, E.D. (1990). Novel allosteric sites on human erythrocyte acetylcholinesterase identified by two monoclonal antibodies. *Arch. Biochem. Biophys.* 277: 361-367.
- Olson, P.F., Fessler, L.I., Stern, R.E., Campbell, A.G. y Fessler, J.H. (1990). Glutactin, a novel *Drosophila* basement membrane-related glycoprotein with sequence similarity to serine esterases. *EMBO J.* 9: 1219-1227.
- Ordentlich, A., Barak, D., Kronman, C., Flashner, Y., Leitner, M., Ariel, N., Cohen, S., Velan, B. y Shafferman, A. (1993). Dissection of the human acetylcholinesterase active center determinants of substrate specificity. Identification of residues constituting the anionic site, the hydrophobic site, and the acyl pocket. *J. Biol. Chem.* 268: 17083-17095.
- Ott, P., Ariano, B.H., Binggeli, Y. y Brodbeck, U. (1983). A monomeric form of human erythrocyte membrane acetylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta* 729: 193-199.
- Parker, C.A. y Rees, W.T. (1962). Fluorescence spectrometry. *Analyst* 87: 83-111.
- Patinkin, D., Seidman, S., Eckstein, F., Benseler, F., Zakut, H. y Soreq, H. (1990). Manipulations of cholinesterase gene expression modulate murine megakaryocytopoiesis in vitro. *Mol. Cell Biol.* 10: 6046-6050.
- Patinkin, D., Lev-Lehman, E., Zakut, H., Eckstein, F. y Soreq, H. (1994). Antisense inhibition of butyrylcholinesterase gene expression predicts adverse hematopoietic consequences to cholinergic inhibitors. *Cell. Mol. Neurobiol.* 14: 459-473.
- Pérez-Guillermo, F., García-Carmona, F., García-Cánovas, F. y Vidal, C.J. (1987a). Influence of NaCl on the kinetic behaviour of mammalian muscle acetylcholinesterase. *Biochem. Int.* 14: 385-394.
- Pérez-Guillermo, F., Muñoz-Delgado, E. y Vidal, C.J. (1987b). Inhibition of human serum and rabbit cholinesterase by local anesthetics. *Biochem. Pharmacol.* 36: 3593-3596.
- Pérez-Guillermo, F., Martínez-Petrel, C.M., Tarin-Royo, F., Pena-Macías, M.J., Álvarez-Ossorio, R., Álvarez-Gómez, J.A. y Vidal, C.J. (1988). Prolonged suxamethonium-induced neuromuscular blockade associated with organophosphate poisoning. *Br. J. Anaesth.* 61: 233-236.
- Pérez-Tur, J., Barat, A., Ramos, M. y Ramírez, G. (1991). Chondroitinases release acetylcholinesterase from chick skeletal muscle. *FEBS Lett.* 286: 25-27.

- Perry, E.K., Perry, R.H., Blessed, G. y Tomlinson, B.E. (1977). Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet* i: 189
- Perry, E.K., Tomlinson, B.E., Blessed, G., Bergmann, K., Gibson, P.H. y Perry, R.H. (1978). Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *Br. Med. J.* 2: 1457-1459.
- Perry, E.K., Curtis, M., Dick, D.J., Candy, J.M., Atack, J.R., Bloxham, C.A., Blessed, G., Fairbairn, A., Tomlinson, B.E. y Perry, R.H. (1985). Cholinergic correlates of cognitive impairment in Parkinson's disease: comparisons with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 48: 413-421.
- Pezzementi, L., Reinheimer, E.J. y Pezzementi, M.L. (1987). Acetylcholinesterase from skeletal muscle of the lamprey *Petromyzon marinus* exists in globular and asymmetric forms. *J. Neurochem.* 48: 1753-1760.
- Pezzementi, L., Nickson, H.C. y Bradley, R.J. (1988). Lamprey brain contains globular and asymmetric forms of acetylcholinesterase. *Neurochem. Int.* 12: 131-135.
- Pezzementi, L., Nickson, H.C., Dunn, R.C. y Bradley, R.J. (1989). Molecular forms of acetylcholinesterase from the skeletal muscle of the ammocoete of the lamprey *Petromyzon marinus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 2: 385-387.
- Plummer, D.T. (1978). *An introduction to practical biochemistry*. McGraw-Hill Book Company (UK) Limited, London.
- Pollard, J.W. (1984). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. En: *Methods in molecular biology, Vol. 1, Proteins*, pp. 81-96. Edit. por J.M. Walker. Humana Press, Clifton, New Jersey.
- Prieto, A.L., Fuentes, M.E., Arqueros, L. e Inestrosa, N.C. (1989). Phosphatidylinositol-specific phospholipase C solubilized G₂ acetylcholinesterase from plasma membranes of chromaffin cells. *J. Neurosci. Res.* 24: 169-173.
- Primo-Parma, S.L., Bartels, C.F., Lightstone, H., Van Der Spek, A.F.L. y La Du, B.N. (1992). Heterogeneity of the silent phenotype of human butyrylcholinesterase. Identification of eight mutations. En: *Multidisciplinary approaches to cholinesterase functions*, pp. 61-64. Edit. por A. Shafferman y B. Velan. Plenum Press, New York.
- Ptitsyn, O.B., Pain, R.H., Semisotnov, G.V., Zevornik, E. y Razgulyaev, O.I. (1990). Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding. *FEBS Lett.* 262: 20-24.
- Ptitsyn, O.B. (1992). *Protein Folding*. W.H. Freeman and Co., New York.
- Ptitsyn, O.B. (1995a). Molten globule and protein folding. *Adv. Protein Chem.* 47: 83-229.
- Ptitsyn, O.B. (1995b). How the molten globule became. *TIBS* 20: 376-379.
- Quinn, D.M. (1987). Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics and virtual transition states. *Chem. Rev.* 87: 955-979.

- Quinn, D.M., Pryor, A.N., Selwood, T., Lee, B.H., Acheson, S.A. y Barlow, P.N. (1991). The chemical mechanism of acetylcholinesterase reactions. Biological catalysis at the speed limit. En: *Cholinesterases: structure, function, mechanism, genetics and cell biology*, pp. 252-257. Edit. por J. Massoulié, F. Bacou, E.A. Barnard, A. Chatonnet, B.P. Doctor y D.M. Quinn. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Quinn, D.M., Selwood, T., Pryor, A.N., Lee, B.H., Leu, L.S., Acheson, S.A., Silman, I., Doctor, B.P. y Rosenberry, T.L. (1992). Criptic catalysis and cholinesterase function. En: *Multidisciplinary approaches to cholinesterase functions*, pp. 141-148. Edit. por A. Shafferman y B. Velan. Plenum Press, New York.
- Rademacher, T.W., Parekh, R.B. y Dwek, R.A. (1988). Glycobiology. *Annu. Rev. Biochem.* 57: 785-838.
- Radic, Z., Reiner, E. y Taylor, P. (1991). Role of the peripheral anionic site on acetylcholinesterase: inhibition by substrates and coumarin derivatives. *Mol. Pharmacol.* 39: 98-104.
- Rakonczay, Z. y Brimijoin, S. (1985). Immunochemical differences among molecular forms of acetylcholinesterase in brain and blood. *Biochim. Biophys. Acta* 832: 127-134.
- Rakonczay, Z. y Brimijoin, S. (1986). Monoclonal antibodies to rat brain acetylcholinesterase: comparative affinity for soluble and membrane-associated enzyme and for enzyme from different vertebrate species. *J. Neurochem.* 46: 280-287.
- Rakonczay, Z. y Brimijoin, S. (1988). Biochemistry and pathophysiology of the molecular forms of cholinesterases. En: *Subcellular biochemistry* 12, pp. 335-378. Edit. por J.R. Harris. Plenum Press, New York.
- Rakonczay, Z. (1988). Cholinesterase and its molecular forms in pathological states. *Prog. Neurobiol.* 31: 311-330.
- Rakonczay, Z. (1991). Cholinesterase molecular forms in neurological diseases. En: *Cholinesterases: structure, function, mechanism, genetics and cell biology*, pp. 310-314. Edit. por J. Massoulié, F. Bacou, E.A. Barnard, A. Chatonnet, B.P. Doctor y D.M. Quinn. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Ralston, J.S., Rush, R.S., Doctor, B.P. y Wolfe, A.D. (1985). Acetylcholinesterase from fetal bovine serum: purification and characterization of soluble G₄ enzyme. *J. Biol. Chem.* 260: 4312-4318.
- Ramírez, G., Gómez-Barriocanal, J., Barát, A. y Rodríguez-Borrajo, C. (1984). Two classes of collagen-tailed molecular forms of acetylcholinesterase. En: *Cholinesterases: fundamental and applied aspects*, pp. 115-128. Edit. por M. Brzin, E.A. Barnard y D. Sket. Walter de Gruyter, Berlin-New York.
- Randall, W.R. (1994). Cellular expression of a cloned, hydrophilic, murine acetylcholinesterase. Evidence of palmitoylated membrane-bound forms. *J. Biol. Chem.* 269: 12367-12374.

- Randall, W.R., Rimer, M. y Gough, N.R. (1994). Cloning and analysis of chicken acetylcholinesterase transcripts from muscle and brain. *Biochim. Biophys. Acta* 1218: 453-456.
- Rasmussen, A.G., Sorensen, K., Selmer, J., Zeuthen, J., Bjerrum, O.J., Brodbeck, U. y Norgaard-Pedersen, B. (1987). Immunochemical determination of acetylcholinesterase in amniotic fluid: an evaluation of eleven monoclonal antibodies. *Clin. Chim. Acta* 166: 17-25.
- Raveh, L., Ashani, Y., Levy, D., De la hoz, D., Wolfe, A.D. y Doctor, B.P. (1989). Acetylcholinesterase prophylaxis against organophosphate poisoning. Quantitative correlation between protection and blood-enzyme level in mice. *Biochem. Pharmacol.* 38: 529-534.
- Ravin, H.A., Zacks, S.I. y Seligman, A.M. (1953). Histochemical localization of acetylcholinesterase in nervous tissue. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 107: 37-53.
- Razon, N., Soreq, H., Roth, E., Bartal, A. y Silman, I. (1984). Characterization of activities and forms of cholinesterases in human primary brain tumors. *Exp. Neurol.* 84: 681-695.
- Rieger, F., Bon, S., Massoulié, J., Cartaud, J., Picard, B. y Benda, P. (1976). *Torpedo marmorata* acetylcholinesterase; a comparison with the *Electrophorus electricus* enzyme: molecular forms, subunits, electron microscopy, immunological relationships. *Eur. J. Biochem.* 68: 513-521.
- Rigghetti, P.G. (1989). *Protein structure: a practical approach*. IRL Press, Oxford.
- Ripoll, D.R., Faerman, C.H., Axelsen, P.H., Silman, I. y Sussman, J.L. (1993). An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5128-5132.
- Roberts, W.L. y Rosenberry, T.L. (1986). Selective radiolabeling and isolation of the hydrophobic membrane-binding domain of human erythrocyte acetylcholinesterase. *Biochemistry* 25: 3091-3098.
- Roberts, W.L., Myher, J.J., Kuksis, A., Low, M.G. y Rosenberry, T.L. (1988). Lipid analysis of the glycoinositol phospholipid membrane anchor of human erythrocyte acetylcholinesterase: palmitoylation of inositol results in resistance to phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 263: 18766-18775.
- Roberts, W.L., Doctor, B.P., Foster, J.D. y Rosenberry, T.L. (1991). Bovine brain acetylcholinesterase primary sequence involved in intersubunit disulfide linkages. *J. Biol. Chem.* 266,(12): 7481-7487.
- Robertson, E.F., Dannelly, H.K., Malloy, P.J. y Reeves, H.C. (1987). Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. *Anal. Biochem.* 167: 290-294.
- Robertson, R.T. y Yu, J. (1993). Acetylcholinesterase and neural development: new tricks for an old dog? *News Physiol. Sci.* 8: 266-272.

- Rosenberry, T.L. (1975a). Catalysis by acetylcholinesterase: evidence that the rate-limiting step for acylation with certain substrates precedes general acid-base catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 3834-3838.
- Rosenberry, T.L. (1975b). Acetylcholinesterase. *Adv. Enzymol.* **43**: 103-218.
- Rosenberry, T.L. y Richardson, J.M. (1977). Structure of 18S and 14S acetylcholinesterase. Identification of collagen-like subunits that are linked by disulfide bonds to catalytic subunits. *Biochemistry* **16**: 3550-3558.
- Rosenberry, T.L. (1979). Quantitative simulation of endplate currents at neuromuscular junctions based on the reaction of acetylcholine with acetylcholine receptor and acetylcholinesterase. *Biophys. J.* **26**: 263-290.
- Rosenberry, T.L., Barnett, P. y Mays, C. (1980). The collagen-like subunits of acetylcholinesterase from the eel *Electrophorus electricus*. *Neurochem. Int.* **2**: 135-148.
- Rossi, S.G. y Rotundo, R.L. (1992). Cell surface acetylcholinesterase molecules on multinucleated myotubes are clustered over the nucleus of origin. *J. Cell Biol.* **119**: 1657-1667.
- Rotundo, R.L. y Fambrough, D.M. (1980). Secretion of acetylcholinesterase: relation to acetylcholine receptor metabolism. *Cell* **22**: 595-602.
- Rotundo, R.L. (1984a). Purification and properties of the membrane-bound form of acetylcholinesterase from chicken brain. Evidence for two distinct polypeptide chains. *J. Biol. Chem.* **259**: 13186-13194.
- Rotundo, R.L. (1984b). Asymmetric acetylcholinesterase is assembled in the Golgi apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 479-483.
- Rotundo, R.L. (1984c). Synthesis, assembly, and processing of acetylcholinesterase in tissue cultured muscle. En: *Cholinesterases: fundamental and applied aspects*. Edit. por M. Brzin, E.A. Barnard y D. Sket. Walter de Gruyter, Berlin.
- Rotundo, R.L. (1987). Biogenesis and regulation of acetylcholinesterase. En: *The vertebrate neuromuscular junction*, pp. 247-284. Edit. por M.M. Salpeter. Liss, A.R., New York.
- Rotundo, R.L. y Carbonetto, S.T. (1987). Neurons segregate clusters of membrane-bound acetylcholinesterase along their neurites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 2063-2067.
- Rotundo, R.L. (1988). Biogenesis of acetylcholinesterase molecular forms in muscle: evidence for a rapidly turning over, catalytically inactive precursor pool. *J. Biol. Chem.* **263**: 19398-19406.
- Rotundo, R.L., Gómez, A.M., Fernández-Valle, C. y Randall, W.R. (1988). Allelic variants of acetylcholinesterase: genetic evidence that all acetylcholinesterase forms in avian nerves and muscles are encoded by a single gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 7805-7809.

- Rotundo, R.L., Thomas, K., Porter-Jordan, K., Benson, R.J.J., Fernández-Valle, C. y Fine, R.E. (1989). Intracellular transport, sorting and turnover of acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **264**: 3146-3152.
- Rotundo, R.L. y Gómez, A.M. (1990). Nucleus-specific translation and assembly of acetylcholinesterase multinucleated muscle cells. *J. Cell Biol.* **110**: 715-719.
- Rotundo, R.L., Fernández-Valle, C., Gómez, A.M., Barton, F. y Left, P. (1991). Regulation of acetylcholinesterase expression in electrically excitable cells. En: *Cholinesterases: structure, function, mechanism, genetics and cell biology*, pp. 146-151. Edit. por J. Massoulié, F. Bacou, E.A. Barnard, A. Chatonnet, B.P. Doctor y D.M. Quinn. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Ruberg, M., Rieger, F., Villageois, A., Bonnet, A.M. y Agid, Y. (1986). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in frontal cortex and cerebrospinal fluid of demented and non-demented patients with Parkinson's disease. *Brain Res.* **362**: 83-91.
- Rubin, L.L., Chalfin, N.A., Adamo, A. y Klymkowsky, M. (1985). Cellular and secreted forms of acetylcholinesterase in mouse muscle cultures. *J. Neurochem.* **45**: 1932-1940.
- Sáez-Valero, J., Tornel, P.L., Muñoz-Delgado, E. y Vidal, C.J. (1993). Amphiphilic and hydrophilic forms of acetyl- and butyrylcholinesterase in human brain. *J. Neurosci. Res.* **35**: 678-689.
- Sáez-Valero, J. y Vidal, C.J. (1995). Monomers and dimers of acetylcholinesterase in human meningioma are anchored to the membrane by glycosylphosphatidylinositol. *Neurosci. Lett.* **195**: 101-104.
- Sáez-Valero, J. y Vidal, C.J. (1996). Biochemical properties of acetyl- and butyrylcholinesterase in human meningioma. *Biochim. Biophys. Acta* **1317**: 210-218.
- Sáez-Valero, J., Poza-Cisneros, G. y Vidal, C.J. (1996). Molecular forms of acetyl- and butyrylcholinesterase in human glioma. *Neurosci. Lett.* **206**: 173-176.
- Sáez-Valero, J., Sberna, G., McLean, C.A., Masters, C.L. y Small, D.H. (1997). Glycosylation of acetylcholinesterase as diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Lancet* **350**: 929
- Sakai, M., Saisu, H., Koshigoe, N. y Abe, T. (1985). Detergent-soluble form of acetylcholinesterase in the electric organ of electric rays. Its isolation, characterization and monoclonal antibodies. *Eur. J. Biochem.* **148**: 197-206.
- Sánchez-Yagüe, J., Cabezas, J.A. y Llanillo, M. (1990). Subcellular distribution and characterization of acetylcholinesterase activities from sheep platelets: relationships between temperature-dependence and environment. *Blood* **76**: 737-744.
- Sánchez-Yagüe, J., Cabezas, J.A. y Llanillo, M. (1991). Effect of cholesterol supplementation on acetylcholinesterase activity from sheep platelet plasma membrane. *Biochem. Pharmacol.* **42**: 2037-2040.

- Schägger, H. y von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 368-379.
- Schmidt, B.M. y Rylett, R.J. (1993). Phosphorylation of rat brain choline acetyltransferase and its relationship to enzyme activity. *J. Neurochem.* **61**: 1774-1781.
- Schmidt, H., Oettling, G. y Drews, U. (1988). Muscarinic receptor-mediated intracellular Ca^{+2} mobilization in embryonic chick heart cells. *FEBS Lett.* **230**: 35-37.
- Schrag, J.D., Li, Y., Wu, S. y Cygler, M. (1991). Ser-His-Glu-triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature* **351**: 761-764.
- Schumacher, M., Camp, S., Maulet, Y., Newton, M., MacPhee-Quigley, K., Taylor, S.S., Friedmann, T. y Taylor, P. (1986). Primary structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. *Nature* **319**: 407-409.
- Schumacher, M., Maulet, Y., Camp, S. y Taylor, P. (1988). Multiple messenger RNA species give rise to the structural diversity in acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **263**: 18979-18987.
- Schwarz, M., Glick, D., Loewenstein, Y. y Soreq, H. (1995). Engineering of human cholinesterase explains and predicts diverse consequences of administration of various drugs and poisons. *Pharmac. Ther.* **67**: 283-322.
- Schweitzer, E.S. (1993). Regulated and constitutive secretion of distinct molecular forms of acetylcholinesterase from PC12 cells. *J. Cell Sci.* **106**: 731-740.
- Scott, L.J.C., Bacou, F. y Sanes, J.R. (1988). A synapse-specific carbohydrate at the neuromuscular junction: association with both acetylcholinesterase and a glycolipid. *J. Neurosci.* **8**: 932-944.
- Seibert, F.S., Tabcharani, J.A., Chang, X.-B., Dulhanty, A.M., Mathews, C., Hanrahan, J.W. y Riordan, J.R. (1995). cAMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator residue Ser-753 and its role in channel activation. *J. Biol. Chem.* **270**: 2158-2162.
- Seidman, S., Ben Aziz-Aloya, R., Timberg, R., Loewenstein, Y., Velan, B., Shafferman, A., Liao, J., Norgaard-Pedersen, B., Brodbeck, U. y Soreq, H. (1994). Overexpressed monomeric human acetylcholinesterase induces subtle ultrastructural modifications in developing neuromuscular junctions of *Xenopus laevis* embryos. *J. Neurochem.* **62**: 1670-1681.
- Semisotnov, G.V., Rodionova, N.A., Kutysenko, V.P., Ebert, B., Blanck, J. y Ptitsyn, O.B. (1987). Sequential mechanism of refolding of carbonic anhydrase B. *FEBS Lett.* **224**: 9-13.
- Shafferman, A., Velan, B., Ordentlich, A., Kronman, C., Grosfeld, H., Leitner, M., Flashner, Y., Cohen, S., Barak, D. y Ariel, N. (1992a). Substrate inhibition of acetylcholinesterase: residues involved in signal transduction from the surface to the catalytic center. *EMBO J.* **11**: 3561-3568.

- Shafferman, A., Kronman, C., Flashner, Y., Leitner, M. y Grosfeld, H. (1992b). Mutagenesis of human acetylcholinesterase. Identification of residues involved in catalytic activity and in polypeptide folding. *J. Biol. Chem.* **267**: 17640-17648.
- Shinitzky, M., Dudai, Y. y Silman, I. (1973). Spectral evidence for the presence of tryptophan in the binding site of acetylcholinesterase. *FEBS Lett.* **30**: 125-128.
- Sikorav, J.L., Krejci, E. y Massoulié, J. (1987). cDNA sequences of *Torpedo marmorata* acetylcholinesterase: primary structure of the precursor of a catalytic subunit; existence of multiple 5'-untranslated regions. *EMBO J.* **6**: 1865-1873.
- Sikorav, J.L., Duval, N., Anselmet, A., Bon, S., Krejci, E., Legay, C., Osterlund, M., Reimund, B. y Massoulié, J. (1988). Complex alternative splicing of acetylcholinesterase transcripts in *Torpedo* electric organ: primary structure of the precursor of the glycolipid-anchored dimeric form. *EMBO J.* **7**: 2983-2993.
- Silman, I., Lyles, J.M. y Barnard, E.A. (1978). Intrinsic forms of acetylcholinesterase in skeletal muscle. *FEBS Lett.* **4**: 166-170.
- Silman, I., Di Giamberardino, L., Lyles, J., Couraud, J.Y. y Barnard, E.A. (1979). Parallel regulation of acetylcholinesterase and pseudocholinesterase in normal, denervated and dystrophic chicken skeletal muscle. *Nature* **280**: 160-162.
- Silman, I. y Futerman, A.H. (1987). Modes of attachment of acetylcholinesterase to the surface membrane. *Eur. J. Biochem.* **170**: 11-22.
- Silver, A. (1974). The biology of cholinesterases. En: *Frontiers of biology*, Vol 36. Edit. por A. Neuberger y E.L. Tatum. Elsevier, Amsterdam.
- Sinclair, J. y Rickwood, D. (1981). Two-dimensional gel electrophoresis. En: *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*, pp. 189-218. Edit. por B.D. Hames y D. Rickwood. IRL Press, Oxford and Washington, D.C.
- Sine, J.P., Toutant, J.P., Weigel, P. y Colas, B. (1992). Amphiphilic forms of butyrylcholinesterase in mucosal cells of rat intestine. *Biochemistry* **31**: 10893-10900.
- Skau, K.A. y Brimijoin, S. (1978). Release of acetylcholinesterase from rat hemidiaphragm preparations stimulated through the phrenic nerve. *Nature* **275**: 224-226.
- Skau, K.A. y Brimijoin, S. (1980). Multiple molecular forms of acetylcholinesterase in rat vagus nerve, smooth muscle and heart. *J. Neurochem.* **35**: 1151-1154.
- Sketelj, J. y Brzin, M. (1985). Asymmetric molecular forms of acetylcholinesterase in mammalian skeletal muscles. *J. Neurosci. Res.* **14**: 95-103.
- Small, D.H., Reed, G., Whitefield, B. y Neurcombe, V. (1995). Cholinergic regulation of neurite outgrowth from isolated chick sympathetic neurons in culture. *J. Neurosci.* **15**: 144-151.
- Smith, A.D., Jobst, K.A., Navaratnam, D.S., Shen, Z.X., Priddle, J.D., Mc Donald, B., King, E. y Esiri, M.M. (1991). Anomalous acetylcholinesterase in lumbar cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Lancet* **338**: 1538

- Sorensen, K., Brodbeck, U., Rasmussen, A.G. y Norgaard-Pedersen, B. (1987). An inhibitory monoclonal antibody to human acetylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta* 912: 56-62.
- Soreq, H. y Zakut, H. (1990a). *Cholinesterase genes: multileveled regulation; monographs in human genetic*. Karger, Basel.
- Soreq, H. y Zakut, H. (1990b). Amplification of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase genes in normal and tumor tissues: putative relationship to organophosphorous poisoning. *Pharmacol. Res.* 7: 1-7.
- Soreq, H., Ben-Aziz, R., Prody, C.A., Seidman, S., Gnatt, A., Neville, L., Lieman-Hurwitz, J., Lev-Lehman, E., Ginzberg, D., Lapidot-Lifson, Y. y Zakut, H. (1990). Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinesterase reveals a G+C-rich attenuating structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9688-9692.
- Soreq, H., Ehrlich, G., Lapidot-Lifson, Y., Gnatt, A., Neville, L., Ben-Aziz, R., Seidman, S., Ginzberg, D. y Zakut, H. (1992). Amplification and mutagenesis of the acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes in primary human tumors. En: *Gene amplification in mammalian cells*, pp. 417-428. Edit. por R.E. Kellm. Marcel Dekker Inc., New York.
- Soreq, H. y Zakut, H. (1993). *Human cholinesterases and anticholinesterases*. Academic Press, San Diego, CA.
- Soreq, H., Patinkin, D., Lev-Lehman, E., Grifman, M., Ginzberg, D., Eckstein, F. y Zakut, H. (1994). Antisense oligonucleotide inhibition of acetylcholinesterase gene expression induces progenitor cell expansion and suppresses hematopoietic apoptosis ex vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7907-7911.
- Soreq, H. y Seidman, S. (1997). The non-catalytic role and complex management of acetylcholinesterase in the mammalian brain call for RNA-based therapies. En: *Progress in Alzheimer's and Parkinson's diseases: recent advances*. Edit. por A. Fisher, M. Yoshida y I. Hanin. Eds. Plenum Press, New York.
- Soto, C., Brañes, M.C., Alvarez, J. e Inestrosa, N.C. (1994). Structural determinants of the Alzheimer's amyloid β -peptide. *J. Neurochem.* 63: 1191-1198.
- Soto, C., Castaño, E.M., Frangione, B. e Inestrosa, N.C. (1995). The alpha-helical to beta-strand transition in the amino terminal fragment of the beta-peptide modulates amyloid formation. *J. Biol. Chem.* 270: 3063-3067.
- St. George-Hyslop, P.H., Tanzi, R.E., Polinsky, R.J., Haines, J.L., Nee, L., Watkins, P.C., Myers, R.H., Feldman, R.G., Pollen, D., Drachman, D., Growdon, J., Bruni, A., Focin, J.F., Salmon, D., Frommelt, P., Amaducci, L., Sorbi, S., Placentini, S., Stewart, G.D., Hobbs, W.J., Conneally, P.M. y Gusella, J.P. (1987). The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science* 235: 885-890.
- Stedman, E. y Eason, L.H. (1932). Choline-esterase. An enzyme present in the blood serum of the horse. *Biochem. J.* 26: 2056-2066.

- Steinberg, N., Roth, E. y Silman, I. (1990). *Torpedo* acetylcholinesterase is inactivated by thiol reagents. *Biochem. Int.* **21**: 1043-1050.
- Stieger, S., Brodbeck, U., Reber, B. y Brunner, J. (1984). Hydrophobic labeling of the membrane binding domain of acetylcholinesterase from *Torpedo marmorata*. *FEBS Lett.* **168**: 231-234.
- Stieger, S., Brodbeck, U. y Witzemann, V. (1987). Inactive monomeric acetylcholinesterase in the low-salt-soluble extract of the electric organ from *Torpedo marmorata*. *J. Neurochem.* **49**: 460-467.
- Stieger, S., Gentinetta, R. y Brodbeck, U. (1989). Cholinesterases from flounder muscle. Purification and characterization of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored and collagen-tailed forms differing in substrate specificity. *Eur. J. Biochem.* **181**: 633-642.
- Stoscheck, C. (1990). Quantitation of protein. *Meth. Enzymol.* **182**: 50-68.
- Struble, R.L., Cork, L.C., Whittehouse, P.J. y Price, D.L. (1982). Cholinergic innervation in neuritic plaques. *Science* **216**: 413-415.
- Sussman, J.L., Harel, M., Frolow, F., Varon, L., Toker, L., Futerman, A.H. y Silman, I. (1988). Purification and crystallization of a dimeric form of acetylcholinesterase from *Torpedo californica* subsequent to solubilization with phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J. Mol. Biol.* **203**: 821-823.
- Sussman, J.L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L. y Silman, I. (1991). Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* **253**: 872-879.
- Taga, E.M., Waheed, A. y Van Etten, R.L. (1984). Structural and chemical characterization of a homogeneous peptide N-glycosidase from almond. *Biochemistry* **23**: 815-822.
- Takahashi, N. y Nishibe, H. (1981). Almond glycopeptidase acting on aspartyl-glycosylamine linkages. Multiplicity and substrate specificity. *Biochim. Biophys. Acta* **657**: 457-467.
- Takahashi, N. (1992). *CRC handbook of endoglycosidases and glycoamidases*. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Tarentino, A.L. y Plummer, T.H.J. (1982). Oligosaccharide accessibility to peptide: N-glycosidase as promoted by protein-unfolding reagents. *J. Biol. Chem.* **257**: 10776-10780.
- Tavittian, B., Hässig, R., Di Giamberardino, L., Verdière-Sahuqué, M. y Goudou, D. (1991). Contribution of an inactive precursor to the renewal of acetylcholinesterase activity in rat sympathetic neurons. En: *Cholinesterases: structure, function, mechanism, genetics and cell biology*, p. 125. Edit. por J. Massoulié, F. Bacou, E.A. Barnard, A. Chatonnet, B.P. Doctor y D.M. Quinn. American Chemical Society, Washington, D.C.

- Taylor, P. y Lappi, S. (1975). Interaction of fluorescence probes with acetylcholinesterase. The site and specificity of propidium binding. *Biochemistry* **14**: 1989-1997.
- Taylor, P. y Radic, Z. (1994). The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **34**: 281-320.
- Teale, F.W.J. (1960). The ultraviolet fluorescence of protein in neutral solution. *Biochem. J.* **76**: 381-388.
- Tomlinson, G. y Kinsch, E.M. (1989). S-mercuric-N-dansyl-cysteine labels the free sulfhydryl groups of human serum cholinesterase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **158**: 503-507.
- Tornel, P.L. y Vidal, C.J. (1991). CSF acetyl and butyrylcholinesterase activities in children with bacterial meningitis. *Lancet* **337**: 440
- Tornel, P.L. (1992). *Las colinesterasas del líquido cefalorraquídeo en sujetos normales, con meningitis e hidrocefalia. Su relación con las enzimas del encéfalo y del plasma*. Tesis doctoral, Universidad de Murcia, Murcia.
- Tornel, P.L., Sáez-Valero, J. y Vidal, C.J. (1992). *Ricinus communis* agglutinin I reacting and non-reacting butyrylcholinesterase in human cerebrospinal fluid. *Neurosci. Lett.* **145**: 59-62.
- Tornel, P.L., Campoy, F.J. y Vidal, C.J. (1993). Cholinesterases in cerebrospinal fluid in patients with meningitis and hydrocephaly. *Clin. Chim. Acta* **214**: 219-225.
- Torres, J.C. e Inestrosa, N.C. (1983). Heparin solubilizes asymmetric acetylcholinesterase from rat neuromuscular junction. *FEBS Lett.* **154**: 265-268.
- Torres, J.C. e Inestrosa, N.C. (1985). Interaction of heparin with multimolecular aggregates of acetylcholinesterase. *Cell. Mol. Neurobiol.* **5**: 303-309.
- Toutant, J.P., Massoulié, J. y Bon, S. (1985). Polymorphism of pseudocholinesterase in *Torpedo marmorata* tissues: comparative study of the catalytic and molecular properties of this enzyme with acetylcholinesterase. *J. Neurochem.* **44**: 580-592.
- Toutant, J.P. (1986). An evaluation of the hydrophobic interactions of chick muscle acetylcholinesterase by charge shift electrophoresis and gradient centrifugation. *Neurochem. Int.* **9**: 111-119.
- Toutant, J.P. y Massoulié, J. (1987). Acetylcholinesterase. En: *Mammalian ectoenzymes*, pp. 289-328. Edit. por A.J. Kenny y A.J. Turner. Elsevier, Amsterdam.
- Toutant, J.P. y Massoulié, J. (1988). Cholinesterases: tissue and cellular distribution of molecular forms and their physiological regulation. *Hand. Exp. Pharmacol.* **86**: 225-265.
- Toutant, J.P., Arpagaus, M. y Fournier, D. (1988). Native molecular forms of head acetylcholinesterase from adult *Drosophila melanogaster*. quaternary structure and hydrophobic character. *J. Neurochem.* **50**: 209-218.

- Toutant, J.P., Roberts, W.L., Murray, N.R. y Rosenberry, T.L. (1989). Conversion of human erythrocyte acetylcholinesterase from an amphiphilic to a hydrophilic form by phosphatidylinositol-specific phospholipase C and serum phospholipase D. *Eur. J. Biochem.* **180**: 503-508.
- Toutant, J.P., Krall, J.A., Richards, M.K. y Rosenberry, T.L. (1991). Rapid analysis of glycolipid anchors in amphiphilic dimers of acetylcholinesterase. *Cell Mol. Neurobiol.* **11**: 219-230.
- Treter, V., Altram, F. y Marz, L. (1991). Peptide-N⁴-(N-acetyl- β -glucosaminyl)asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached α 1-3 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue. *Eur. J. Biochem.* **199**: 647-652.
- Treskatis, S., Ebert, C. y Layer, P.G. (1992). Butyrylcholinesterase from chicken brain is smaller than that from serum: its purification, glycosylation and membrane association. *J. Neurochem.* **58**: 2236-2247.
- Trojanowski, J.Q. y Lee, V.M. (1995). Phosphorylation of paired helical tau filaments in Alzheimer's disease neurofibrillary lesions: focusing on phosphatases. *FASEB J.* **9**: 1570-1576.
- Tsim, K.W.K., Randall, W.R. y Barnard, E.A. (1988a). An asymmetric form of muscle acetylcholinesterase contains three subunit types and two enzymatic activities in one molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 1262-1266.
- Tsim, K.W.K., Randall, W.R. y Barnard, E.A. (1988b). Identification of a 17 S asymmetric butyrylcholinesterase in chick muscle by monoclonal antibodies. *Neurosci. Lett.* **86**: 245-249.
- Tsim, K.W.K., Randall, W.R. y Barnard, E.A. (1988c). Synaptic acetylcholinesterase of chicken muscle changes during development from a hybrid to homogeneous enzyme. *EMBO J.* **7**: 2451-2456.
- Vallette, F.M., Vigny, M. y Massoulié, J. (1986). Muscle differentiation of chicken myotubes in a simple defined synthetic culture medium and in serum supplemented media: expression of the molecular forms of acetylcholinesterase. *Neurochem. Int.* **8**: 121-133.
- Vallette, F.M., De la Porte, S. y Massoulié, J. (1991). Regulation and distribution of acetylcholinesterase molecular forms in vivo and in vitro. Cholinesterases: structure, function, mechanism, genetics and cellular biology. *Am. Chem. Soc.* 98-102.
- Vallette, F.M. y Massoulié, J. (1991). Regulation of the expression of acetylcholinesterase by muscular activity in avian primary cultures. *J. Neurochem.* **56**: 1518-1525.
- Van der Goot, F.G., González-Mañas, J.M., Lakey, J.H. y Pattus, F. (1991). A "molten globule" membrane-insertion intermediate of the pore-forming domain of colicin A (see comments). *Nature* **354**: 408-410.

- Velan, B., Grosfeld, H., Kronman, C., Leitner, M., Gozes, Y., Lazar, A., Flashner, Y., Marcus, D., Cohen, S. y Shafferman, A. (1991). The effect of elimination of intersubunit disulfide bonds on the activity, assembly, and secretion of recombinant human acetylcholinesterase. Expression of acetylcholinesterase Cys-580 → Ala mutant. *J. Biol. Chem.* 266: 23977-23984.
- Velan, B., Kronman, C., Ordentlich, A., Flashner, Y., Leitner, M., Cohen, S. y Shafferman, A. (1993). N-glycosylation of human acetylcholinesterase: effects on activity, stability and biosynthesis. *Biochem. J.* 296: 649-656.
- Vellom, D.C., Radic, Z., Li, Y., Pickering, N.A., Camp, S. y Taylor, P. (1993). Amino acid residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity. *Biochemistry* 32: 12-17.
- Verdière-Sahuqué, M., García, L., Dreyfus, P.A., Goudou, D., Nicolet, M. y Rieger, F. (1991). Phosphatidylinositol is involved in the attachment of tailed asymmetric acetylcholinesterase to neuronal membranes. *Cell Mol. Neurobiol.* 11: 203-218.
- Vidal, C.J. (1996). Glycosylation of cholinesterases and its alteration in some pathological processes. *Recent Res. Devel. Neurochem.* 1: 37-54.
- Vigny, M., Bon, S., Massoulié, J. y Leterrier, F. (1978a). Active-site catalytic efficiency of acetylcholinesterase molecular forms in *Electrophorus*, *Torpedo*, rat and chicken. *Eur. J. Biochem.* 85: 317-323.
- Vigny, M., Gisiger, V. y Massoulié, J. (1978b). "Nonspecific" cholinesterase and acetylcholinesterase in rat tissues: molecular forms, structural and catalytic properties and significance of the two enzyme systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 2588-2592.
- Vigny, M., Bon, S., Massoulié, J. y Gisiger, V. (1979). The subunit structure of mammalian acetylcholinesterase: catalytic subunits, dissociating effect of proteolysis and disulfide reduction on the polymeric forms. *J. Neurochem.* 33: 559-565.
- Viratelle, O.M. y Bernhard, S.A. (1980). Major component of acetylcholinesterase in *Torpedo* electroplax is not basal lamina associated. *Biochemistry* 19: 4999-5007.
- Wang, Y. y Roach, P.J. (1993). Purification and assay of mammalian protein (serine/threonine) kinases. En: *Protein phosphorylation. A practical approach*, pp. 121-143. Edit. por D.G. Hardie. Oxford University Press Inc., New York.
- Wasserman, L., Doctor, B.P., Gentry, M.K. y Taylor, P. (1993). Epitope mapping of form-specific and nonspecific antibodies to acetylcholinesterase. *J. Neurochem.* 61: 2124-2132.
- Webb, C.P. y Greenfield, S.A. (1992). Non-cholinergic effects of acetylcholinesterase in the substantia nigra: a possible role for an ATP-sensitive potassium channel. *Exp. Brain Res.* 89: 49-58.
- Weiner, L., Kreimer, D., Roth, E. y Silman, I. (1994). Oxidative stress transforms acetylcholinesterase to a molten-globule-like state. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198: 915-922.

- Weise, C., Kreienkamp, H.J., Raba, R., Pedak, A., Aaviksaar, A. y Hucho, F. (1990). Anionic subsites of the acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: affinity labelling with the cationic reagent N,N-dimethyl-2-phenyl-aziridium. *EMBO J.* **9**: 3885-3888.
- Welch, W. y Georgopoulos, C. (1993). Heat-shock proteins or chaperones. *Ann. Rev. Cell Biol.* **9**: 601-634.
- Willbold, E. y Layer, P.G. (1992). A hidden retinal regenerative capacity from the chick ciliary margin is reactivated in vitro, that is accompanied by down-regulation of butyrylcholinesterase. *Eur. J. Neurosci.* **4**: 210-220.
- Wilson, I.B. y Bergmann, F. (1950). Studies on cholinesterase. VII. The active surface of acetylcholinesterase derived from effect of pH on inhibitors. *J. Biol. Chem.* **185**: 479-489.
- Winker, M.A. (1994). Tacrine for Alzheimer's disease, which patient, what dose? *JAMA* **271**: 1023-1024.
- Wolfe, A.D., Rush, R.S., Doctor, B.P., Koplovitz, I. y Jones, D. (1987). Acetylcholinesterase prophylaxis against organophosphate toxicity. *Fundam. Appl. Toxicol.* **9**: 266-270.
- Wolfe, A.D. (1989). The monoclonal antibody AE-2 modulates fetal bovine serum acetylcholinesterase substrate hydrolysis. *Biochim. Biophys. Acta* **997**: 232-235.
- Wolleman, M. y Zoltan, L. (1962). Cholinesterase activity of cerebral tumors and tumorous cysts. *Arch. Neurol.* **6**: 161-167.
- Woolf, N.J. y Butcher, L.L. (1990). Dysdifferentiation of structurally plastic neurons initiates the pathological cascade of Alzheimer's disease. En: *Brain cholinergic systems*. Edit. por M. Steriade y D. Biesold. OUP, Oxford.
- Wright, C.I., Geula, C. y Mesulam, M.M. (1993). Protease inhibitors and indoleamines selectively inhibit cholinesterases in the histopathologic structures of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 683-686.
- Yassine, M., Bacou, F. y Alami-Durante, H. (1991). Biochemical characteristics of cholinesterases from Bar tissues. En: *Cholinesterases: function, mechanism, genetics and cell biology*, p. 47. Edit. por J. Massoulié, F. Bacou, E.A. Barnard, A. Chatonnet, B.P. Doctor y D.M. Quinn. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Younkin, S.G., Rosenstein, C., Collins, P.L. y Rosenberry, T.L. (1982). Cellular localization of molecular forms of acetylcholinesterase in rat diaphragm. *J. Biol. Chem.* **257**: 13630-13637.
- Younkin, S.G., Goodridge, B., Katz, J., Lockett, G., Nafziger, D., Usiak, M.F. y Younkin, L.H. (1986). Molecular forms of acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Fed. Proc.* **45**: 2982-2988.

- Zakut, H., Even, L., Birkenfeld, S., Malinger, G., Zisling, R. y Soreq, H. (1988). Modified properties of serum cholinesterases in primary carcinomas. *Cancer* 61: 727-737.
- Zakut, H., Ehrlich, G., Ayalon, A., Prody, C.A., Malinger, G., Seidman, S., Ginzberg, D., Kehlenbach, R. y Soreq, H. (1990). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes coamplify in primary ovarian carcinomas. *J. Clin. Invest.* 86: 900-908.